



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA**

Curriculum Fisiopatologico

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

STUDI SU UN CASO DI DISFIBRINOGENEMIA ACQUISITA

RELATORE

Prof. Aldo Paolicchi

CORRELATORI

Dott.ssa Laura Caponi

Dott.ssa Sonia Albertini

CANDIDATA

Monica Martelloni

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

	Pagina
Riassunto	4
Abstract	6
1. Introduzione	8
1.1 Emostasi	8
1.2 Fasi della coagulazione secondo il modello cellulare	9
1.2.1 Fase d'inizio	10
1.2.2 Fase di amplificazione	11
1.2.3 Fase di propagazione	11
1.3 Riesame della via intrinseca della coagulazione	12
1.4 Fibrinolisi	14
1.5 Regolazione del processo coagulativo	15
1.6 Funzione piastrinica	17
1.7 Alterazione dell'emostasi	19
1.7.1 Malattie emorragiche	19
1.7.2 Malattie trombotiche	21
1.8 Il fibrinogeno	22
1.8.1 Struttura del fibrinogeno	22
1.8.1.1 Struttura della molecola in microscopia elettronica e siti di clivaggio della plasmina	24
1.8.1.2 Analisi cristallografica della molecola del fibrinogeno	24
1.8.1.3 Formazione del coagulo	27
1.9 Siti attivi di legame sul fibrinogeno e fibrina	29
1.10 Sintesi del fibrinogeno	32
1.10.1 Sintesi proteica	33
1.10.2 Eterogeneità della molecola del fibrinogeno	34
1.11 Alterazioni patologiche: disfibrinogenemie	34

1.11.1	Disfibrinogenemie congenite	34
1.11.2	Disfibrinogenemie acquisite o secondarie	36
1.11.3	Casi in letteratura di disfibrinogenemia associata a MGUS	38
1.12	Test di laboratorio per lo screening delle disfibrinogenemie	39
1.13	Misurazione dei livelli di fibrinogeno nel plasma	41
1.14	Catene leggere libere (FLC)	42
1.14.1	La storia	42
1.14.2	Struttura delle immunoglobuline	44
1.14.3	Le catene leggere e pesanti delle immunoglobuline sono costituite di regioni costanti e variabili	45
1.14.4	Struttura della catena leggera	45
1.14.5	Sintesi delle catene leggere	46
1.14.6	Metabolismo delle catene leggere libere	48
1.14.7	Clearance renale	49
1.14.8	Emivita di immunoglobuline (Ig) e di catene leggere libere (FLC)	49
1.14.9	Alterazioni del metabolismo delle catene leggere libere	50
1.15	Tecniche di studio delle catene leggere libere	52
2.	Scopo dello studio	54
3.	Materiali e metodi	55
3.1	Pazienti e controlli sani	55
3.1.1	Paziente del caso clinico in studio	55
3.1.2	Gruppo di controllo di pazienti con componente monoclonale	57
3.1.3	Gruppo di controllo di soggetti sani	58
3.2	Metodi	59
3.2.1	Metodo di dosaggio del fibrinogeno coagulativo secondo Clauss	59
3.2.2	Metodo di dosaggio del tempo di protrombina (PT)	59
3.2.3	Metodo di determinazione del tempo di trombina (TT)	60
3.2.4	Metodo di dosaggio del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT)	61
3.2.5	Mixing test: dosaggi del Fibrinogeno coagulativo (Fgc) del	

paziente in esame con aggiunta di pool di plasmi normali (PPN)	
a tempi e temperature diverse	62
3.2.6 Precipitazione del fibrinogeno	63
3.2.7 Precipitazione del fibrinogeno dal plasma del paziente in studio	64
3.2.8 Dialisi all'equilibrio	65
3.2.9 Prove di mixing con fibrinogeno purificato	66
3.2.10 Dosaggio delle catene leggere libere (FLC)	69
3.2.11 Immunofissazione delle proteine	70
4. Risultati e discussione	71
4.1 Dosaggi del fibrinogeno coagulativo secondo Clauss (Fgc), tempo di trombina (TT) e catene leggere libere k e λ (FLC-k e FLC- λ)	71
4.2 Risultati dei dosaggi del Fgc nella soluzione di mix tra la plasma del paziente e pool di plasmi normali (PPN) a tempi diversi e temperature diverse	74
4.3 Messa a punto del metodo di precipitazione del fibrinogeno	76
4.4 Dosaggio del fibrinogeno purificato dai campioni di plasma del paziente in studio, in date diverse	77
4.5 Prove di mixing con Fg purificato dal pool di plasmi normali (PPN) e Fg purificato dal plasma del paziente in studio	78
4.6 Prove di mixing con plasma del paziente e Fg purificato del PPN	79
4.6.1. Prove di mixing tra Fg purificato del PPN e Fg purificato dei quattro campioni di controllo con malattia	80
4.7 Immunofissazione	83
4.7.1 Immunofissazione del caso clinico in studio	83
4.7.2 Immunofissazione su siero e plasma dei controlli con malattia	86
5. Conclusioni	88
6. Bibliografia	90
Ringraziamenti	103

RIASSUNTO

I disordini del fibrinogeno generalmente sono causati da mutazioni genetiche che possono esitare in ridotti livelli di proteina (ipofibrinogenemia) o in una sintesi di molecola anomala (disfibrinogenemia). Fattori interni al processo coagulativo o microambientali possono determinare l'insorgenza di un difetto acquisito della concentrazione o della funzione del fibrinogeno. Ad esempio gli anticorpi possono legare il fibrinogeno e/o la fibrina interferendo con la polimerizzazione ed inibendo quindi il processo coagulativo.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare la causa della disfibrinogenemia acquisita riscontrata in un paziente di 65 anni, clinicamente silente, che presentava un profilo coagulativo anomalo con evidente perdita dell'attività funzionale del fibrinogeno, senza riscontro di alterazioni al tracciato elettroforetico. Avendo eseguito in altra sede un dosaggio immunologico del fibrinogeno, risultato nella norma, si è ipotizzato un interessamento della fase di polimerizzazione.

L'immunofissazione eseguita sul plasma del paziente evidenziava una banda monoclonale a livello delle catene leggere libere di tipo k (FLC-k), in prossimità della banda del fibrinogeno. Parallelamente, in un gruppo di 20 pazienti affetti da mieloma multiplo (sia micro che macromolecolare), è stato valutato il tempo di trombina (TT), espressione della disfunzione del fibrinogeno, per evidenziare se in alcuni di essi fosse presente un suo allungamento.

Allo scopo di indagare la funzionalità del fibrinogeno del paziente e l'interferenza della FLC-k con esso, abbiamo precipitato e purificato il fibrinogeno del paziente, di un pool di plasmi normali e dei quattro campioni con mieloma multiplo (nei quali il TT risultava alterato) per eseguire prove di mixing.

Ulteriori riscontri sono stati eseguiti utilizzando il dosaggio delle FLC sia su plasma che su siero del paziente in esame.

La terapia con desametasone ha portato alla normalizzazione dei tempi di coagulazione (tempo di protrombina e tempo di tromboplastina parziale attivata) e solo ad una parziale correzione del TT. Due mesi dopo il termine della terapia si è notata una lenta e

progressiva riduzione della concentrazione dei livelli di fibrinogeno coagulativo ed un contestuale allungamento del tempo di trombina fino a risultare nuovamente incoagulabile.

Concludendo, l'ipotesi che la catena leggera possa interferire a livello di siti attivi presenti sulla molecola di fibrinogeno, quali quello per fattore XIII oppure a livello dell'integrina IIB/IIIA per il legame con le piastrine, venivano esclusi in quanto il paziente mostrava l'assenza di manifestazioni emorragiche ed una normale funzionalità piastrinica documentata con i test di aggregazione.

Un'ipotesi di lavoro da sviluppare sarà quella di verificare se la FLC-k interferisca nella prima fase di polimerizzazione alterando il rilascio del fibrinopeptide A e/o B.

ABSTRACT

Fibrinogen disorders are usually caused by genetic mutations that can result in reduction of protein levels (hypofibrinogenemia) or in an abnormal synthesis of the molecule (dysfibrinogenemia). Factors involved in the coagulation process or microenvironment may determine the onset of an acquired defect concentration or the function of fibrinogen. For example the antibodies may bind fibrinogen and/or fibrin by interfering with the polymerization and thereby inhibiting the clotting process.

The aim of our study was to investigate the cause of the acquired dysfibrinogenemia found in a patient 65 years old, clinically silent, which had an abnormal coagulation profile with evident loss of fibrinogen functional activity, without detection of alterations in the electrophoretic pattern. Having also performed an immunoassay of fibrinogen, with a result in accord with normal values, it has been suggested an involvement of the polymerization step.

The immunofixation performed on the patient's plasma showed a band at the level of monoclonal free light chains of type k (FLC-k), in strict proximity of fibrinogen band. At the same time, in a group of 20 subjects with multiple myeloma (both micro and macromolecular), was rated the thrombin time (TT), expression of fibrinogen dysfunction, to evaluate if in some of these patients was present an elongation of TT.

In order to investigate fibrinogen functionality of the patient and the interference of the FLC-k upon it, we have precipitated and purified the fibrinogen of the patient, the fibrinogen of a pool of normal plasma, and the other four samples with multiple myeloma (in which the TT was altered) to perform tests of mixing. To support our study, we have compared the level of monoclonal free light chains of type K both serum and plasma, of the same patient.

Treatment with dexamethasone led to normalization of clotting times (prothrombin time and activated partial thromboplastin time) and only partial correction of the TT. After two months of the end of therapy there has been a slow and progressive reduction of the concentration of the levels of fibrinogen clotting and a concurrent lengthening of the thrombin time again up to be anticoagulated.

In conclusion, the hypothesis that the light chain may interfere at the level of the active sites present on the molecule of fibrinogen, such as for factor XIII or at the level of integrin IIB/IIIA, necessary for the bond with the platelets, were excluded because the patient showed the absence of hemorrhagic manifestations and a normal platelet function documented by the aggregation test.

The next step of work, for future study, that will be developed, is to verify if the FLC-k interfere in the first stage of polymerization by altering the release of fibrinopeptide A and/or B.

1. INTRODUZIONE

1.1. Emostasi

L'emostasi è una catena di reazioni biochimiche e cellulari, sequenziali e sinergiche, che hanno lo scopo di riparare un vaso sanguigno danneggiato, di mantenere il sangue allo stato fluido e di rimuovere i coaguli di sangue dopo il ripristino dell'integrità vascolare (Bizzozzero *et al.* 1881). Negli anni sessanta due gruppi di ricerca costruirono, in maniera indipendente, un modello che assomigliava ad una cascata ed è per questo che prese il nome di "modello a cascata della coagulazione" (Davie *et al.* 1964, Macfarlane *et al.* 1964).

Secondo questa teoria ciascun fattore della coagulazione è un proenzima che viene convertito in enzima attivo dal fattore attivato a monte della cascata (Figura 1).

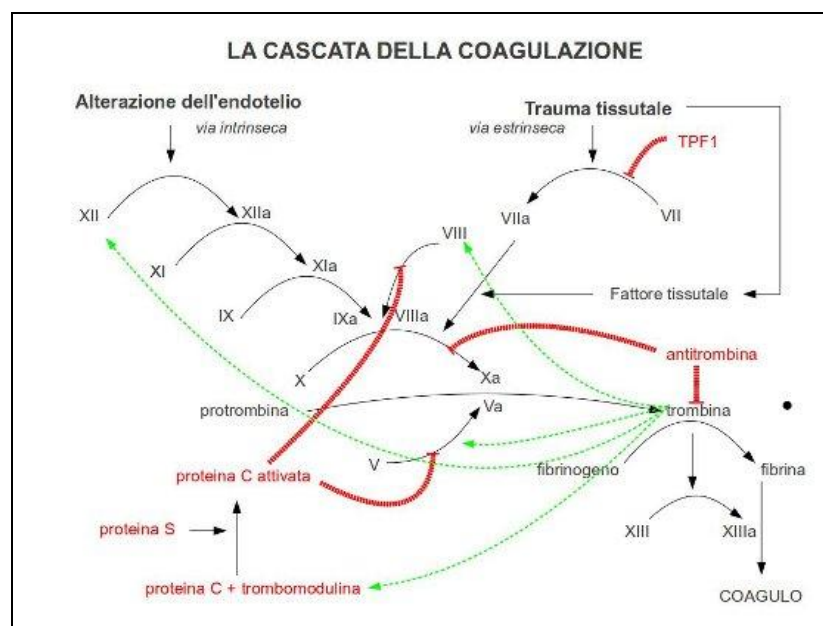


Figura 1. La cascata della coagulazione secondo la visione classica

Fu anche suggerita l'esistenza di due differenti cascate che convergono nell'attivazione del fattore X:

- a- "via intrinseca" in cui tutti componenti sono presenti nel sangue;

b- “via estrinseca” che necessita di un fattore extravascolare, il fattore Tissutale (TF).

a- La via intrinseca si attiva in vitro quando il sangue entra in contatto con superfici idrofile. Ciò è innescato dal Fattore XII attivato che, convertendo la precallicreina in callicreina, guida il processo verso una attivazione sequenziale dei fattori XI, IX , X e II (protrombina).

b- La via estrinseca inizia con l’attivazione del fattore VII in seguito al legame con il fattore tissutale; il complesso TF-VIIa induce direttamente l’attivazione del F.X e del F.II (*Henri et al. 2013*).

L’attuale concetto di emostasi sostiene che, a seguito di una lesione endoteliale, le piastrine aderiscono nella sede del danno con conseguente aggregazione mediata da interazioni tra i recettori presenti sulla loro superficie e ligandi extracellulari, ma con proteine solubili. La lesione endoteliale porta all’esposizione del TF sub endoteliale, generando tracce di trombina con conseguenti molteplici effetti su altri fattori della coagulazione e sulle piastrine (*Henri et al. 2013*).

1.2. Fasi della coagulazione secondo il modello cellulare

Secondo l’attuale modello cellulare (*Monroe et al. 2006*), la coagulazione può essere suddivisa in tre fasi (figura 2): 1) *una fase di inizio* in cui viene generata una piccola quantità di fattori emocoagulativi attivi, 2) *una fase di amplificazione* in cui la quantità di fattori attivi è potenziata e 3) *una fase di propagazione* in cui i fattori della coagulazione si legano ai recettori presenti sulla membrana delle piastrine attivate, altamente pro-coagulanti, con conseguente formazione di coaguli di fibrina. Anche se questo modello di coagulazione biologico-cellulare sta riscuotendo successo, la classica suddivisione in via intrinseca ed estrinseca è ancora ampiamente utilizzata (*Mackman et al. 2009*).

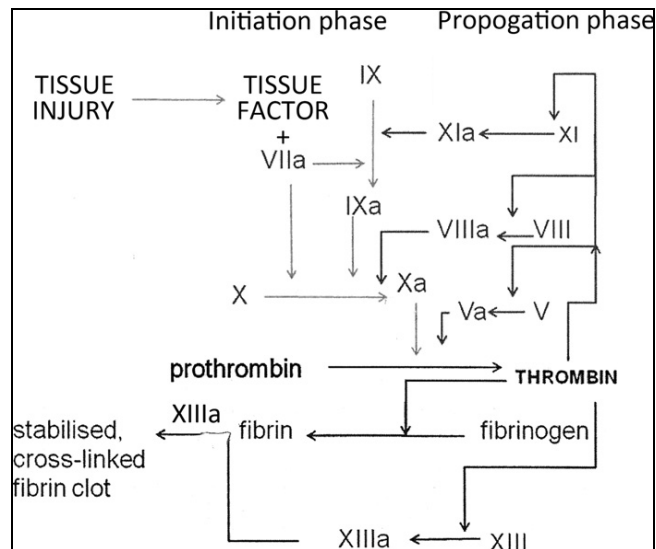


Figura 2. Modello cellulare della coagulazione raffigurante le interconnessioni tra la via intrinseca ed estrinseca
(tratto da McMichael M., *New Models of Hemostasis Topics in Companion An Med* 2012)

1.2.1. Fase d'inizio

Questa prima fase, classicamente riferita alla via estrinseca della coagulazione, inizia quando l'integrità vascolare viene perturbata e le cellule sub-endoteliali, come le cellule muscolari ed i fibroblasti, si trovano esposte al flusso sanguigno (figura 3) (*Monroe et al 2006*). Queste cellule espongono un iniziatore chiave della coagulazione, il TF, che lega il fattore VII, attivandolo. Il TF, glicoproteina trans-membrana ubiquitaria, è presente in forma inattiva ma, in certe condizioni, viene prontamente convertito nella configurazione attiva; non è ben noto come avvenga l'attivazione del fattore VII a VIIa, ma un ruolo proteolitico è suggerito dalla piccola quantità di fattore VIIa che circola nel sangue (*Neuenschwander et al 1993*). A concentrazioni fisiologiche il fattore VIIa, non legato a TF, mostra bassa attività; ciò sarebbe legato alla presenza di un'unica caratteristica sequenza che mantiene il fattore VIIa in una conformazione simile a quella dello zimogeno. Di conseguenza l'attività del fattore VIIa, a livelli fisiologici, è interamente dipendente dal TF (*Petrovan et al. 2001*).

Il complesso TF/FVIIa agisce proteolicamente su piccole concentrazioni di F.IX e F.X con formazione, rispettivamente, di F.IXa e F.Xa (forme attive).

Questo permette l'assemblamento, sulle cellule che esprimono il fattore tissutale, tra i fattori Xa ed il cofattore, fattore Va, con formazione *del complesso protrombinasi* (Monroe et al. 2006) che converte la protrombina (F.II) in trombina (Figura 3). Il fattore Xa può dissociarsi dalle cellule che esprimono TF per formare i *complessi protrombinasi* su membrane cellulari distanti. Tale diffusione è limitata dalla presenza nel plasma di inibitori delle proteasi, come l'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI) e l'antitrombina (inibitore delle serin-proteasi) (Broze et al. 1988, Jesty et al. 1978). Il fattore IX, invece, non essendo bersaglio del TFPI, può diffondere più facilmente verso altre superfici cellulari, partecipando così alla *fase di propagazione*.

1.2.2. Fase di amplificazione

La quantità di trombina lentamente accumulata andrà ad attivare un numero maggiore di piastrine, adese nel sito del danno. Parallelamente, la trombina converte il fattore V in FVa, che: a) amplificando l'attività protrombinasica, converte il fattore XI in XIa, b) scinde il legame tra il fattore von Willebrand (vWF) ed il fattore VIII, favorendone il rilascio, e, c) successivamente, favorisce la conversione del FVIII a FVIIIa che, agendo come cofattore per il FIXa sulla superficie delle piastrine attivate, porta alla generazione di fattore Xa (Hoffman et al. 2003).

Le piastrine, reclutate nel sito del danno durante questa fase, forniscono la superficie fosfolipidica procoagulante per l'assemblaggio dei fattori necessari alla *fase di propagazione*. (figura 3)

1.2.3. Fase di propagazione

La fase di propagazione necessita di superfici contenenti fosfolipidi pro-coagulanti, ad es. le piastrine attivate. Il fattore XIa converte il FIX in FIXa che poi si associa al FVIII (fig. 2). La carenza o l'assenza di fattore VIII o IX determinano gravi complicanze emorragiche (emofilia A o B rispettivamente), sottolineando l'importanza di questi fattori coagulativi per una emostasi adeguata. Il complesso fattore IXa/VIIIa catalizza la conversione del FX in FXa, dopodiché il complesso FXa/FVa induce la formazione di quantità di trombina sufficiente per

una massiccia formazione di fibre di fibrina. Come step finale, la trombina attiva la transglutaminasi plasmatica FXIIIa che, catalizzando la produzione di legami covalenti crociati tra monomeri di fibrina adiacenti, formando come un elastico, porta ad un coagulo di fibrina polimerizzata insolubile (Petrovan *et al.* 2001).

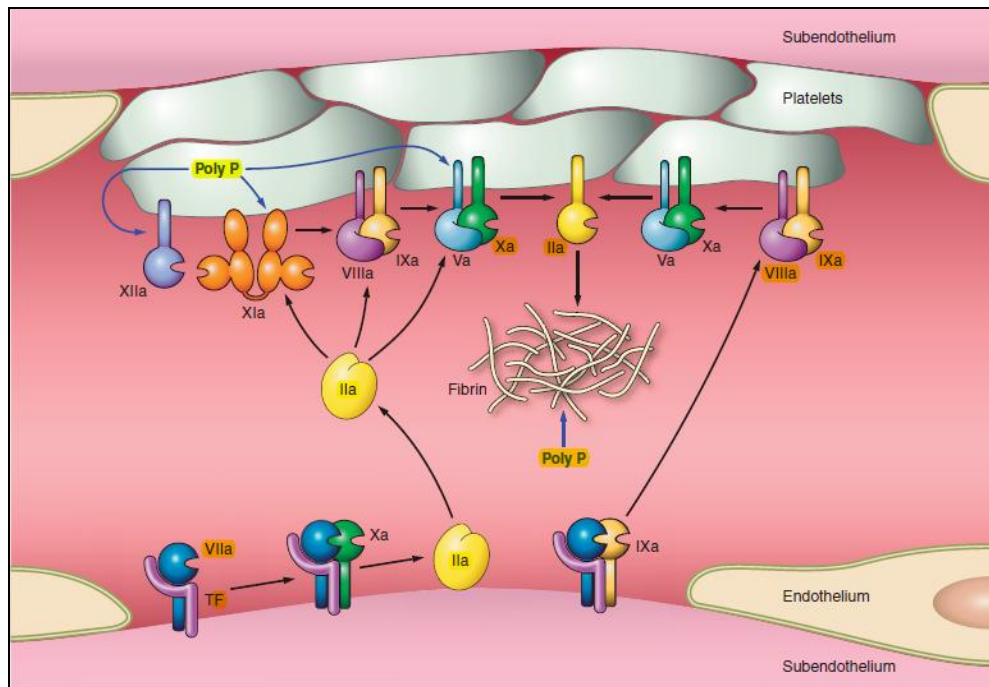


Figura 3. Attivazione del fattore VII in seguito all'esposizione del fattore tissutale da parte dell'endotelio danneggiato e successive attivazioni del FX e IX da parte del complesso TF-FVIIa (tratto da Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Pieter H. Reitsma *New fundamentals in hemostasis, Physiol* 2013; Rev 93: 327–358)

1.3. Riesame della via intrinseca della coagulazione

Secondo il modello biologico cellulare della coagulazione, la via intrinseca serve ad amplificare il ciclo avviato dalla via estrinseca (TF-FVII); tuttavia diverse evidenze indicano che tale modello sottovaluterebbe il ruolo della via intrinseca. Studi recenti indicano che la via intrinseca della coagulazione è attivata pressoché parallelamente alla via estrinseca. Sono stati scoperti tre attivatori fisiologici della prima: il collagene (Van der Meijden *et al.* 2009), i polimeri di fosfato lineari (detti polifosfati) (Renne *et al.* 2007), e le trappole dei neutrofili extracellulari (NETs) (Von Bruhl *et al.* 2012).

I polifosfati, di derivazione piastrinica, legano ed attivano il fattore XII determinando così la successiva attivazione della callicreina plasmatica, del fattore XI e dei fattori della coagulazione a valle (*Muller et al. 2009*). E' stato proposto un ruolo per i polifosfati di derivazione piastrinica in quanto le piastrine sono abbondantemente presenti nelle sedi di danno vascolare. L'attivazione del fattore XII dipendente dai polifosfati non sembra portare ad una più rapida formazione del coagulo, ma piuttosto sembra contribuire ad una maggiore stabilità del coagulo di fibrina (*Pauer et al. 2004, Ratnoff et al. 1955*). Questo potrebbe spiegare perché livelli elevati di fattore XII siano associati con eventi trombotici, mentre la carenza di FXII renderebbe instabile il coagulo e sembrerebbe favorire fenomeni di embolizzazione. Recenti studi indicano che i polifosfati possono agire come cofattori nell'attivazione del FV e FXI mediata dalla trombina (*Choi et al. 2011*), e possono inibire la fibrinolisi presumibilmente attraverso l'attivazione del Thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) (*Smith et al. 2010*). Le catene più corte di polifosfati piastrinici sembrano essere più attive nella conversione del fattore V, mentre le catene più lunghe sembrano dare maggior contributo all'attivazione del fattore XII; ciò suggerisce che differenti pool di polifosfati agiscono su vie distinte (*Smith et al. 2010*).

Recentemente è stato dimostrato che un'altra fonte di fosfato, ossia RNA extracellulare, può stimolare l'attivazione di componenti della via intrinseca (quali il FXII e FXI); ciò è stato associato ad eventi trombotici piuttosto che con deficit dell'emostasi (*Kannemeier et al. 2007*).

Anche i NETs guidano l'attivazione del fattore XII a FXIIa, influenzando la formazione del coagulo (*Von Bruhl et al. 2012*).

In conclusione si può ipotizzare che l'attivazione dei fattori V e XI dipendente dai polifosfati e dai Nets, giochi un ruolo nell'emostasi, mentre l'attivazione del FXII dipendente dai polifosfati e dall' RNA giochi un ruolo nella determinazione di trombosi.

1.4. Fibrinolisi

La fibrinolisi è essenziale per la dissoluzione del coagulo ma sembra essere anche importante nella riparazione del danno tissutale (*Smith et al. 2011*). In condizioni fisiologiche la fibrinolisi nel sangue è contenuta dall'abbondanza di inibitori della fibrinolisi stessa. Per un funzionamento ottimale il sistema fibrinolitico richiede presenza di fibrina, essenziale all'inibizione di una fibrinolisi inadeguata (assenza di coagulo). Il plasminogeno, sintetizzato dal fegato, viene trasformato dall'attivatore del plasminogeno (tPA) in plasmina; tale attivazione è potenziata dalla presenza di fibrina. La plasmina degrada i polimeri di fibrina con formazione di frammenti denominati, nel loro complesso, prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP). La degradazione del polimero di fibrina insolubile porta alla formazione dei frammenti D-D (D-dimeri). La presenza dei D-D è indicativa di rottura dei legami crociati del coagulo di fibrina, mentre la presenza degli FDP può indicare degradazione di fibrinogeno, di monomeri di fibrina o dei legami crociati.

Il tPA e l'urochinasi-attivatore del plasminogeno (uPA) rappresentano i due attivatori fisiologici del plasminogeno nei mammiferi (*Booth et al. 2006*). Il tPA è il principale attivatore nel sistema vascolare, mentre l'uPA lo è nel tessuto extravascolare.

Il tPA viene liberato dalle cellule endoteliali in risposta a stimoli come bradichinina, istamina, acetilcolina, agenti alfa-adrenergici e fattori attivanti le piastrine. L'attività enzimatica del tPA è molto debole in assenza di fibrina.

L'uPA è sintetizzato dai fibroblasti, dalle cellule epiteliali, dai monociti e dalle cellule endoteliali. A differenza del tPA, l'uPA può attivare il plasminogeno in assenza di fibrina (*Booth et al. 2006*).

1.5.Regolazione del processo coagulativo

Notevoli sono stati gli sforzi per comprendere i meccanismi regolatori del processo coagulativo. Studi condotti su pazienti che presentavano deficit di inibitori fisiologici della coagulazione e su topi geneticamente modificati, hanno dimostrato come sia necessario un ampio controllo negativo della coagulazione per prevenire un'incontrollata e diffusa formazione di coaguli.

- a) Un primo controllo inibitorio della coagulazione è fornito dalla presenza di inibitori delle proteasi come l'antitrombina (AT), il cofattore eparinico II, il TFPI e il C1 inibitore che favoriscono la clearance dei fattori attivi della coagulazione, interferendo con il loro sito attivo.
- b) Una seconda modalità di inibizione è data dalla via enzimatica Proteina C/Proteina S (PC/PS) (*Henri et al. 2013*).
- c) Il TFPI inibisce il complesso TF-FVIIa-FXa regolando negativamente la coagulazione;
- d) Inoltre la PS può legarsi sul TFPIa contribuendo ad un'ulteriore inibizione dell'attività del FXa.

L'antitrombina è uno dei più importanti inibitori della generazione e dell'attività della trombina. Questo è esemplificato dalla sua alta affinità per tre proteasi chiave della coagulazione: FIXa, FXa, e trombina (Figura 4). Clinicamente, un deficit eterozigote di antitrombina induce un incremento di 10 volte del rischio di trombosi venose. Nell'uomo non è mai stato osservato un deficit omozigote, probabilmente perché non compatibile con la vita (*Demers et al. 1992*). La naturale inattivazione delle proteasi ad opera dell'antitrombina è fortemente rafforzata dall'eparina (*Olson et al. 1991, Olson et al. 2004*). L'attività coagulante del fattore IXa e del complesso protrombinasi dipende rispettivamente dai cofattori FVIIIa e FVa. Fin dal 1980 è noto che la PC attivata (aPC), formando un complesso con la PS, promuove la inattivazione proteolitica del FVIIIa e FVa, sopprimendo l'azione del fattore IXa e del complesso protrombinasi. La PC è una proteina anticoagulante prodotta dal fegato ed ha una certa omologia con i fattori vitamina K dipendenti. Per un completo controllo anticoagulante è necessaria l'attivazione della PC ed il legame di quest'ultima con la PS, anch'essa vitamina K dipendente (*Dahlback et al. 2005*). Il processo coagulativo porta ad un progressivo aumento della formazione di trombina; la trombina si

lega alla trombomodulina (TM), proteina transmembrana di 60 kDa espressa sulle cellule endoteliali (Suzuki *et al.* 1987). Dopo il legame con la TM, la trombina taglia proteolicamente, con conseguente attivazione, la Proteina C (con formazione di aPC) che è legata al suo recettore presente sulla cellula endoteliale (EPCR) (Koutsi *et al.* 2008, Nagashima *et al.* 1993). L'attivazione della PC avviene dopo il clivaggio dell'arginina 169 e la rimozione del peptide di attivazione. Vi sono evidenze che il legame della trombina alla TM non sia strettamente richiesto per l'attivazione della PC, anche se la velocità di clivaggio sia estremamente bassa in assenza di TM (Esmon *et al.* 1989). Per l'estesa superficie endoteliale dei capillari sanguigni, l'attivazione della PC in questi piccoli vasi è relativamente efficiente. Nei grandi vasi, dove il rapporto area della superficie endoteliale/volume sanguigno è basso, l'addizionale presenza di EPCR è richiesta per il legame della proteina C e per la presentazione del complesso trombina-trombomodulina (Laszik *et al.* 1997).

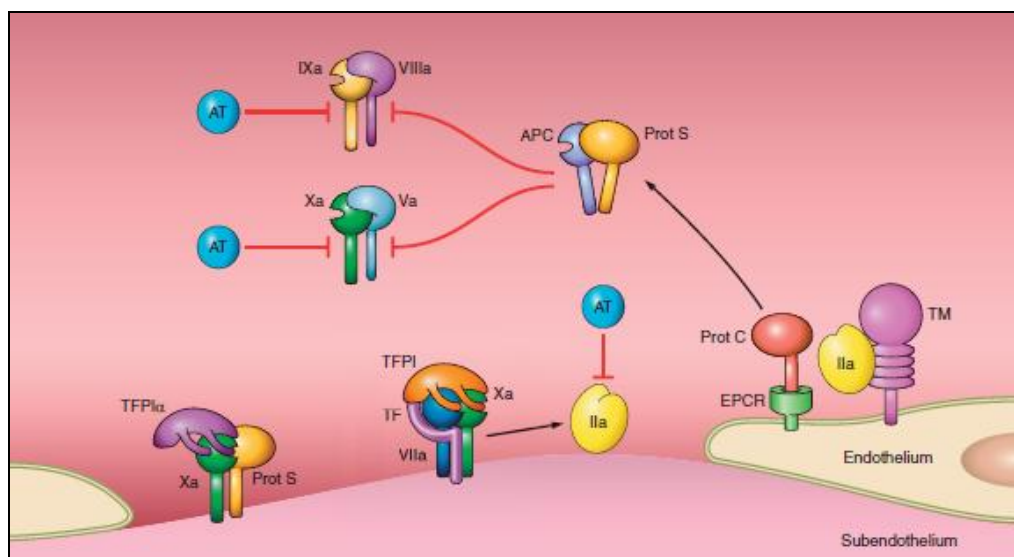


Figura 4. Regolazione del processo coagulativo da parte di aPC/PS, TFPI ed antitrombina (tratto da Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Pieter H. Reitsma *New fundamentals in hemostasis, Physiol 2013; Rev 93: 327–358*)

1.6. Funzione piastrinica

In condizioni fisiologiche in un uomo adulto circolano continuamente, in una superficie vascolare di oltre 1000 m², circa 1×10^{12} piastrine con minima capacità di adesione o di aggregazione. Dopo lesione di un vaso oppure in condizioni di danno o attivazione endoteliale si verificano interazioni rapide e complesse tra le cellule endoteliali, i componenti della matrice extracellulare, le piastrine e il sistema della coagulazione. Il tradizionale concetto di “sigillare” un vaso danneggiato presuppone che:

- a- le piastrine in un primo momento aderiscano ed aggregino a formare un tappo piastrinico primario;
- b- che in un secondo momento si formi il coagulo di fibrina, a seguito dell’attivazione del sistema della coagulazione.

Fasi chiamate *emostasi primaria e secondaria* (Henri et al. 2013).

La visione corrente del processo coagulativo indica una più dinamica e intricata interazione tra la risposta piastrinica, le proteine della coagulazione ed i componenti della parete del vaso. A riposo le piastrine sono mantenute in una forma discoide e in uno stato non aggregante dalle cellule endoteliali, che, da un lato, producono sostanze inibenti le piastrine (es. prostaglandine I₂ e ossido nitrico), e dall’altro metabolizzano agonisti piastrinici come ADP e trombina con formazione di prodotti inattivi (Colman et al. 2001). Le piastrine si attivano a seguito di distruzione o disfunzione endoteliale:

- a- cambiano di forma,
- b- aumentano la loro adesività,
- c- acquisiscono una superficie altamente pro-coagulante.

Studi su topi geneticamente modificati e su pazienti che mostrano difetti genetici (Nurden et al. 2011), hanno dimostrato l’esistenza di diverse classi di glicoproteine di superficie, espresse abbondantemente, essenziali per la risposta primaria delle piastrine. Nella figura 5 è esemplificato il modello di formazione del trombo così come è risultato da numerose ricerche (Nurden et al. 2011, Brass et al. 2011, Gibbins et al. 2004, Munnix et al. 2009, Savage et al. 2007, Stegner et al. 2011, Watson et al 2010). In pratica, le piastrine discoidi interagiscono per mezzo di recettori adesivi con i componenti della matrice extracellulare, il fattore di von Willebrand (vWF) ed il collagene. Le piastrine in seguito

all'adesione si attivano, cambiano la loro forma rotondeggiante emettendo degli pseudopodi, esprimono integrine e secernono agenti autocrini. Le piastrine quindi aggregano tra di loro, grazie alla formazione di ponti per i quali è essenziale il fibrinogeno, produzione di coaguli di fibrina per mezzo dell'azione della trombina ed infine si retraggono con formazione del trombo definitivo. Sulla membrana di queste piastrine, attivate ed aggregate, viene esposta la fosfatidilserina (Munnix *et al.* 2007); si ha notevole aumento della formazione di tenasi e complessi protrombinasi, di fattori della coagulazione attivati che portano a massiccia formazione di trombina. Quindi l'esposizione della fosfatidilserina collega saldamente i processi di attivazione piastrinica con la generazione di trombina (Zwaal *et al.* 1997). Come le piastrine, la trombina gioca un ruolo centrale nell'attivazione dei fattori della coagulazione (Swords *et al.* 2001).

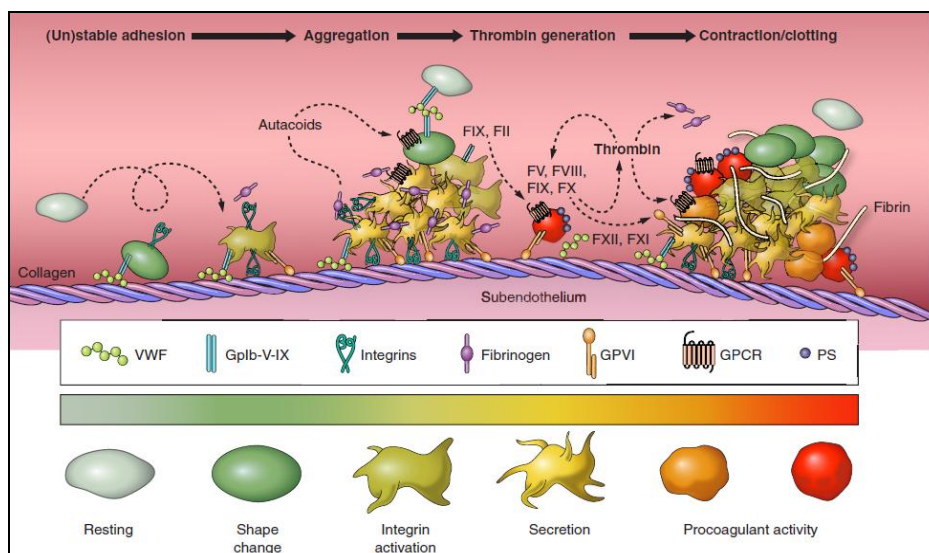


Figura 5. Fasi di attivazione piastrinica e formazione del trombo.

(tratto da Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Pieter H. Reitsma *Physiol New fundamentals in hemostasis* 2013; Rev 93: 327–358)

L'interazione tra il recettore GPIb-V-IX con il vWF rappresenta uno dei primi step nell'attivazione piastrinica. Il vWF è immagazzinato nei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali e nei granuli delle piastrine ma è anche presente in circolo. Una volta liberato dalle cellule endoteliali, il vWF aderisce alla membrana, sulla superficie cellulare, sotto forma

di multimeri ad alto peso molecolare con formazione di caratteristici archi, prima del clivaggio da parte di ADAMS 13. Il vWF, inoltre, lega proteine della matrice cellulare, in particolare collagene di tipo I e III (*Jackson et al. 2003*).

1.7. Alterazione dell'emostasi

Le alterazione del fisiologico sistema emostatico, possono essere suddivise in forme associate a sanguinamento e forme associate a trombosi.

1.7.1. Malattie emorragiche

Le malattie emorragiche possono essere suddivise in malattie associate :

- a- a carenza di fattori della coagulazione;
- b- alterazioni della via fibrinolitica;
- c- ad una conta anomala delle piastrine o ad una riduzione della funzione piastrinica.

- a) I deficit dei singoli fattori della coagulazione sono generalmente congeniti, sebbene si possa sviluppare carenza di un singolo fattore a seguito di una malattia acquisita. Ad es., una coagulopatia acquisita legata a deficit di un singolo fattore, è il deficit del FX associato ad amiloidosi.

Un'altra importante categoria di alterazioni è il deficit multifattoriale dei fattori della coagulazione; numerose sono le patologie associate a carenze multiple. Ad es. deficit di vitamina K e/o assunzione di warfarina (con ridotta concentrazione dei fattori II, VII, IX e X e di PC e PS), la coagulopatia intravascolare disseminata (CID), caratterizzata da consumo di fattori emocoagulativi.

- b) Il deficit di antiplasmina è descritto tra le malattie emorragiche perché la sua assenza porta ad un'aumentata attività plasminica, responsabile di una aumentata lisi del coagulo, con conseguente tendenza al sanguinamento.

c) Le alterazioni dell'emostasi associate alle piastrine si dividono in difetti:

c.1 -quantitativi

c.2 -qualitativi delle piastrine.

c.1 -La piastrinopenia può essere conseguente ad un'aumentata distruzione delle piastrine, da cause immuni e non immuni o da ridotta produzione delle piastrine. Le più comuni cause della ridotta produzione sono l'infiltrazione del midollo osseo da parte di metastasi di neoplasie solide o neoplasie ematologiche e le piastrinopenie indotte da farmaci, come dopo chemioterapia.

Si può avere piastrinopenia per aumentato sequestro splenico, frequente in pazienti con splenomegalia.

Da segnalare anche:

- la trombocitosi reattiva, dove è presente un aumento transitorio del numero delle piastrine conseguente ad esacerbazione degli stimoli responsabili della produzione piastrinica;

- la trombocitosi neoplastica, tipica delle malattie mieloproliferative e, meno frequentemente, delle mielodisplasie.

c.2 -Le malattie qualitative delle piastrine sono caratterizzate da anomalie della funzionalità piastrinica a fronte di una normale conta piastrinica.

La malattia di von Willebrand (vWD) è una malattia in cui è presente un difetto della funzione piastrinica, ad origine extra-piastrinica, poiché il difetto nella vWD risiede principalmente nelle cellule endoteliali. Il vWF attivato ricopre la superficie della piastrina per permetterle di aderire alla superficie danneggiata del vaso ed iniziare la formazione dell'aggregato piastrinico.

Altre cause di malfunzionamento piastrinico sono conseguenti ad anomalie intra-piastriniche, che possono essere congenite o acquisite. Quelle congenite, come la tromboastenia di Glanzmann, la malattia di Bernard-Soulier e lo Storage Pool Disease, sono estremamente rare, mentre le acquisite sono più frequenti (es. farmacologiche dovute all'uso di acido acetilsalicilico, clopidogrel, oppure le alterazioni indotte da uremia) (Laposata, 2012).

1.7.2. Malattie trombotiche

Le coagulopatie associate a trombosi sono raggruppate, e sono suddivise in forme :

- a- ad alto rischio;
- b- a basso rischio.

a- Tra le forme ad alto rischio ci sono quelle legate alla presenza di resistenza alla proteina C attivata (legata alla mutazione del Fattore V Leiden). Tale mutazione è presente nel 3-5% della popolazione caucasica. Altra forma ad alto rischio è la mutazione della protrombina G20210A e la sindrome degli anticorpi anti-fosfolipidi (forma acquisita). Il deficit di AT III rientra nelle forme ad elevato rischio trombotico.

b- Le forme a basso rischio sono rappresentate da deficit di PC e PS. Livelli elevati di omocisteina plasmatica possono rappresentare un fattore di rischio trombotico, soprattutto a livello del versante arterioso. La carenza di plasminogeno è rara e la sua associazione alla trombosi è controversa; altre due rare condizioni- certi tipi di disfibrinogenemia e la trombocitemia essenziale possono rappresentare condizioni predisponenti a trombosi o ad emorragie (*Laposata, 2012*).

1.8. Il Fibrinogeno

Il fibrinogeno (Fg) e la fibrina (Fn) giocano un ruolo importante nel processo della coagulazione, della fibrinolisi, nelle interazioni fra cellule e matrice, nella risposta infiammatoria e nelle neoplasie. Queste funzioni sono regolate da interazioni a livello dei siti attivi della molecola del fibrinogeno; alcuni di questi si presentano mascherati rendendosi disponibili con il processo di fibrino-formazione, con interazioni tra siti del fibrinogeno e/o della fibrina e molecole estrinseche come proenzimi, fattori della coagulazione, inibitori enzimatici, fattori di crescita e recettori cellulari.

1.8.1 Struttura del fibrinogeno

Il fibrinogeno è una glicoproteina ricca di acido sialico, peso molecolare di circa 340 kDa, lunga 45 nm, costituita da 2 subunità identiche, ognuna composta, a sua volta, da tre coppie distinte di catene ($A\alpha$, $B\beta$ e γ), unite da legami disolfuro (*Shafer et al. 1988*). La molecola di Fg contiene 4 catene saccaridiche: una per ciascuna catena $B\beta$ e una per ciascuna catena γ (*Mosesson 1992, Hoepric et al. 1983*). La catena α è invece priva di oligosaccaridi (*Iwanaga et al. 1968*) (Figura 6).

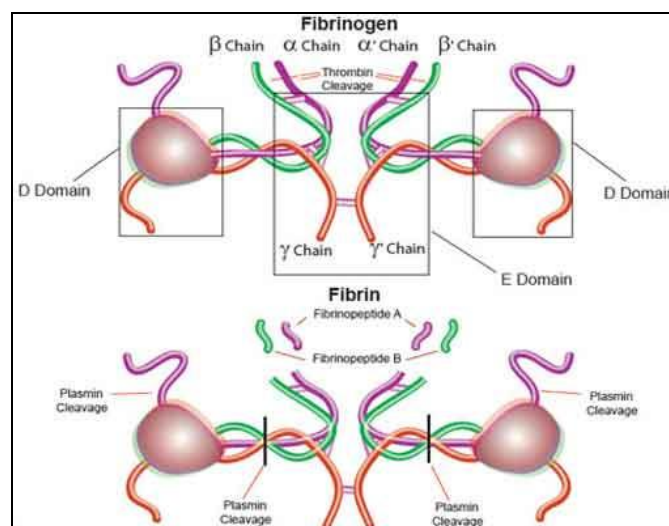


Figura 6. Struttura della molecola del fibrinogeno
(tratto da M. W. Mosesson, *Fibrinogen and fibrin structure and functions. Thromb Haemost* 2005)

Le sequenze amminoacidiche delle 3 catene sono omologhe e si ritiene che originino tutte da un comune precursore ancestrale (*Topfer et al. 1976*). Tuttavia ci sono importanti differenze strutturali e funzionali tra le 3 catene.

Caratteristiche delle 3 catene del fibrinogeno:

	Catena α	Catena β	Catena γ
Peso molecolare	67 kDa	54 kDa	47 kDa
Aminoacidi	610	461	411
Fibrinopeptide	FpA (16 aa)	FpB (14 aa)	Nessuno
Carboidrati	Nessuno	2 oligosaccaridi	2 oligosaccaridi

Varianti minori:

- La variante minore della catena gamma, chiamata γ' , deriva da un processo di trascrizione alternativa dell'RNA (*Topfer et al. 1976, Pizzo et al. 1972*), da cui risulta la sostituzione della γ A 408-411 V con una unica sequenza anionica di 20 amminoacidi (γ' 408-427L) che contiene due tirosine solfato (*Pizzo et al. 1972*). Le catene γ' C rappresentano approssimativamente l'8% del totale delle catene γ del fibrinogeno. Il 15% delle molecole di Fg sono eterodimeri γ A/ γ' (*Doolittle et al. 1979*), mentre <1% sono omodimeri γ'/γ' (*Wolfenstein et al. 1980*).

- La variante A α E (<2%) con un aminoacido in più in posizione 236 all'estremità C-terminale (*McKee et al. 1966*).

Il dimero del fibrinogeno è tenuto insieme da 5 ponti disolfuro, simmetrici, che si formano a livello dell'estremità N-terminale delle 3 catene: un legame tra le due catene A α 28, uno tra le 2 catene γ 8- γ 9, e infine uno tra A α 36 e B β 65 (*Henschen et al. 1983*). Solo i due legami A α -B β e i 2 legami tra le catene γ sono sufficienti e necessari per garantire la formazione del dimero, mentre i due legami tra le catene A α non sono sufficienti a mantenere la struttura dimerica (*Doolittle et al. 1981, Townsend et al. 1982*). Gli anelli disulfurici sono ponti intercatene, non simmetrici (*Francis et al., Wolfenstein et al. 1980*). Le due catene γ sono disposte in maniera antiparallela, così pure i ponti disolfuro tra le 2 catene

(Hoeprich *et al.* 1983). Esistono anche ponti disolfuro all'interno delle catene stesse del Fg (Chung *et al.* 1984, Fornace *et al.* 1984, Francis *et al.* 1988, Mosesson *et al.* 1972).

1.8.1.1. Struttura della molecola in microscopia elettronica e siti di clivaggio della plasmina

Il fibrinogeno è stata la prima macromolecola studiata al microscopio elettronico nel 1959 da Hall e Slayter (Mosesson *et al.* 1972). Essa è composta da tre strutture nodulari collegate tra loro mediante rod-like-strands lineari e presenta una regione centrale E e due regioni terminali D, due regioni α C e due regioni B β N (Figura 7). Le regioni α C sono le prime porzioni della molecola del Fg ad essere clivate dalla plasmina durante la fibrinolisi, con formazione del frammento X. Queste regioni costituiscono la cosiddetta protuberanza A α poichè emergono dalla regione D (Fu *et al.* 1994). Anche le regioni B β N (o regioni β N nella Fn, perché FpB è stato rimosso) vengono rimosse dalla molecola di Fg mediante l'azione della plasmina e sono localizzate alle estremità N-terminali delle catene β (Zhang *et al.* 1993). Infatti sulla catena A α sono presenti 2 siti suscettibili a proteolisi da parte della plasmina. Il clivaggio plasmina-mediato di parte della catena A α (che corrisponde alla regione α C) porta alla formazione del cosiddetto frammento X (Fu *et al.* 1994). L'altro sito d'azione della plasmina è comune a tutte e 3 le catene del Fg ed è localizzato nella regione coiled-coil (Fu *et al.* 1994, Zhang *et al.* 1993) : comporta la formazione di un frammento Y e un frammento D. Infine il frammento Y verrà tagliato in 2 frammenti, rispettivamente D ed E (Huang *et al.* 1993, Blomback *et al.* 1976, Zhang *et al.* 1992, Garlund *et al.* 1977).

1.8.1.2 Analisi cristallografica della molecola del fibrinogeno

Più recentemente, nel 2001, l'analisi cristallografica (Figura 7) del fibrinogeno di pollo ha fornito maggiori informazioni sulla struttura della molecola (Blomback *et al.* 1968) in quanto il fibrinogeno di pollo presenta un'elevata omologia con il Fg umano, mancando però di una porzione flessibile all'estremità C-terminale della catena α che ne impedisce la cristallizzazione (Bouma *et al.* 1978, Henschen *et al.* 1978). Le 3 catene del Fg formano una struttura a tripla elica detta "coiled-coil" lineare, che collega una struttura nodulare centrale, detta regione E, formata dalle estremità N-terminali di tutte e sei le catene del Fg, legate da

ponti disolfurici, a due strutture nodulari distali dette regioni D, formate dalle estremità C-terminali delle sole catene B β e γ (Figura 7).

La regione E comprende 4 domini strutturali distinti:

- γ N domain (estremità N terminali delle due catene γ),
- funnel-shaped domain (estremità N-terminali delle catene A α e B β) e
- 2 coiled-coil E domain (formati dalle estremità C-terminali di tutte e 3 le catene del Fg).

Ciascuna regione D comprende 7 domini strutturali:

- coiled-coil D domain (estremità N terminali di tutte e 3 le catene del Fg)
- NH₂ terminal A-domain ,
- Central B domain
- COOH-terminal Polimerization-domain (ciascuna delle estremità C terminali delle catene β e γ forma 3 domini per un totale i 6 domini complessivi) (*Blomback et al. 1968, Bouma et al. 1978, Hall et al. 1959, Weisel et al. 2001*).

È stata inoltre studiata la struttura della regione α C che comprende una parte compatta (dominio α C) e una parte flessibile (connettore α C) (*Nussenzweig et al. 1961, Takagi et al. 1975*). Le due regioni B β N formano 2 domini che contengono importanti siti funzionali che vengono esposti dopo il clivaggio del FpB (*Marder et al. 1987*).

1.8.1.3 Formazione del coagulo

Ogni catena $A\alpha$ contiene in posizione N-terminale una sequenza, definita fibrinopeptide A (FpA), il clivaggio della quale da parte della trombina attiva l'assemblamento della fibrina tramite l'esposizione di un sito terminale di polimerizzazione Ea (Scheraga et al. 1957, Blomba et al. 1978), mentre un'altra porzione è localizzata in corrispondenza della catena βB . Ogni sito Ea si combina con una sequenza-complementare costitutiva, definita Da, localizzata nel dominio D adiacente così da aprire la strada alla formazione della fibrina e alla formazione di fibrille avvolte a doppio filamento (Scheragaha et al. 1957, Laudano et al. 1978) (Figura 8). Le protofibrille formano legami laterali e bilaterali per creare fibre multi-strato (Liu et al. 1985, Pandya et al. 1985): il primo tipo di legame è chiamato "giunzione bilaterale", in cui un doppio strato di protofibrille si unisce ad un altro doppio strato di protofibrille formando così una struttura a quattro strati, il secondo tipo di legame è chiamato "giunzione equilaterale" e si forma da interazioni convergenti fra tre molecole di fibrina per dare luogo a tre fibrille avvolte a doppio filamento.

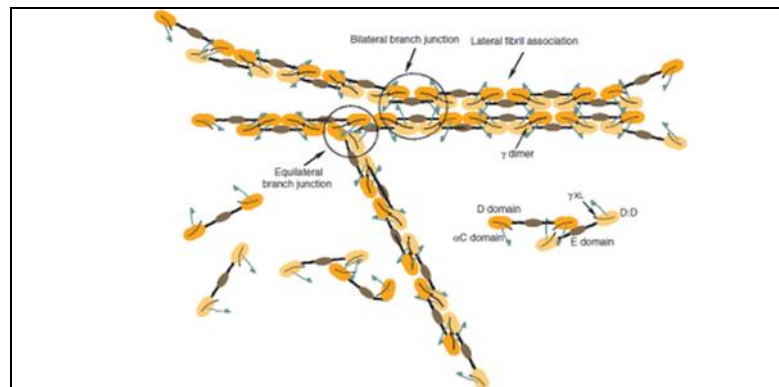


Figura 8. Diagramma schematico dell'assemblamento della fibrina. Mostra l'associazione laterale delle fibrille e la formazione di γ - γ dimeri trasversali. Ci sono due siti con associazione self-costitutiva in una regione della catena γ di ciascun dominio D (il γ modulo) che partecipano all'assemblamento di fibrinogeno e fibrina, e al cross-linking chiamato (γ XL) e D:D (tratto da Mosesson MW, *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. J Thromb Haemost 2005)

Il rilascio del solo FpA è sufficiente per iniziare il processo di assemblamento della fibrina, ma la stabilità delle protofibrille e la formazione di fibre spesse di fibrina richiedono il clivaggio anche del Fibrinopeptide B (FpB) (Weisel *et al.* 1981, Weisel *et al.* 1985, Rao *et al.* 1991). Questo si trova in posizione N-terminale della catena β ed il suo rilascio è più lento di quello del FpA. Il processo espone un'indipendente sito di polimerizzazione Eb (Shainoff *et al.* 1983), che interagisce con il sito Db costitutivo complementare del dominio D. Questa interazione contribuisce ad associazioni laterali tramite l'induzione di riarrangiamenti nella regione β C del dominio D (Figura 9).

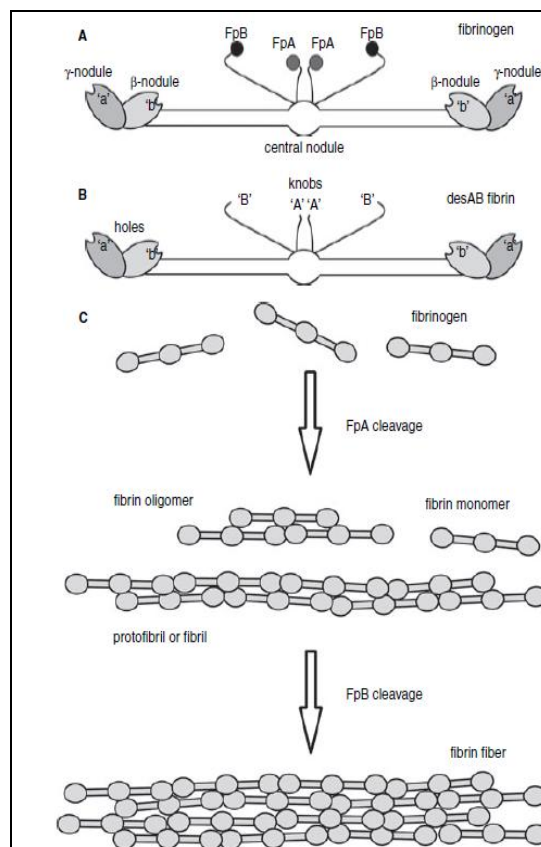


Figura 9. Monomero di fibrina e polimerizzazione:

- A) Molecola del fibrinogeno con FpA e FpB;
- B) Fibrina con esposizione dei siti A e B dopo il clivaggio di FpA e FpB;
- C) Primi stadi di polimerizzazione, formazione di oligomeri, protofibrille e fibre.

(tratto da L Medved, Weisel JW, Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin J. Thromb. Haemost. 2009)

1.9 Siti attivi di legame sul fibrinogeno e fibrina

Il fibrinogeno e la fibrina hanno ruoli che in parte si sovrappongono, in contesti diversi: coagulazione del sangue, fibrinolisi, interazioni cellule-matrice, risposta infiammatoria, guarigione delle ferite, neoplasie. Queste funzioni sono regolate da siti presenti sul fibrinogeno, alcuni dei quali sono mascherati o non accessibili, se non dopo la formazione della fibrina o l'interazione del Fg con altre molecole (*Mosesson et al. 2005*) (figura 10).

Numerosi sono i siti attivi presenti a livello della molecola del Fg/Fn; i più importanti dal punto di vista funzionale sono:

- Legame del complesso A2B2 e soppressione dell'attività di cross linking del FXIIIa nel sangue. Secondariamente anche un eccesso di subunità B nel plasma può costituire un elemento soppressivo di tale attività (*Siebenlist et al. 2001*).
- Il fibrinogeno si lega anche al recettore piastrinico $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa, CD41/CD61), esposto sulle piastrine, favorendo il reclutamento di queste all'interno del trombo in via di formazione (*Peerschke et al. 1985, Marguerie et al. 1979*). Tale recettore è un'integrina che si lega alle sequenze RGD arg-gly-asn-X a livello della catena A α 572-575 (RGDS) e A α 95-98 (RGDF). Il cross linking dei domini αC promuove il signalling integrina-mediato (*Belkin et al. 2005*). L'integrina $\alpha IIb\beta 3$ delle PLT si lega anche alla sequenza γA 400-411 (*Andrieux et al. 1989*) e alla sequenza γA 370-383 presente esclusivamente sul fibrinogeno (*Podolnikova et al. 2003*).

Il legame dell'integrina al sito sulla catena A α o al sito sulla catena γ è mutuamente esclusivo. Questo può essere dovuto al fatto che entrambe le sequenze amminoacidiche sulla catena A α e γ si legano allo stesso sito o su siti sovrapposti dell'integrina, oppure può essere dovuto al fatto che il legame di una sequenza amminoacidica comporta una modifica conformazionale dell'integrina che impedisce il legame dell'altra sequenza amminoacidica del Fg. I risultati degli studi svolti per chiarire la modalità di interazione ha portato alla conclusione che esistano due distinti siti di legame e che una modifica conformazionale conseguente al legame di una delle due sequenze amminoacidiche sia alla base del legame mutuamente esclusivo delle catene γ e A α (*Joel et al. 1988*).

La GP IIB/IIIA esposta dalle PLT non attivate lega esclusivamente il Fg, mentre nelle PLT attivate da agonisti (ADP, epinefrina, trombina), mostra invece uguale capacità di legame con 4 molecole diverse: fibrinogeno (*Bennet et al. 1982*), fibrina (*Plow et al. 1985*), vitronectina (*Thiagarajan et al. 1988, Asch et al. 1990*) e vWF (*Ruggeri et al. 1983*). Inoltre l'integrina delle PLT inattivate presenta elevata affinità di legame esclusivamente per la molecola intatta del Fg, mentre il legame ai frammenti X derivati dalla fibrinolisi è meno efficiente: questo costituisce un sistema di regolazione, fibrinolisi-mediato, del legame delle PLT non stimolate al Fg (*Brian et al. 1991*). Sappiamo che GP IB-IX e vWF sono coinvolti nell'adesione delle PLT non attivate al subendotelio (*Weiss et al. 1978, Sakariassen et al. 1979*), questo potrebbe rappresentare il principale meccanismo di adesione piastrinica in condizioni di elevato shear stress. Invece il meccanismo di adesione delle PLT non attivate, mediato da GP IIB-IIIa, potrebbe diventare importante in condizioni di basso shear stress (*Weiss et al. 1989*).

Nei soggetti con tromboastenia di Glanzmann sono presenti difetti quantitativi o qualitativi di tale integrina ed è alterata l'aggregazione piastrinica (*Marguerie et al. 1979, Peerschke et al. 1985*). Anche mutazioni o delezioni della sequenza $\gamma 316-322$ comportano un deficit di aggregazione delle PLT (*Remijn et al. 2002*). La GP IIB/IIIA interagisce anche con la fibrina ed ha un ruolo nella retrazione del coagulo (cessione di acqua da parte del polimero con conseguente accorciamento dello stesso) (*Gartner et al. 1988*). I siti di legame dell'integrina alla Fn sono diversi da quelli presenti a livello del Fg. I siti di legame della Fn rimangono ad oggi indeterminati. Si è ipotizzato un possibile coinvolgimento delle catene β (*Hamaguchi et al. 1993*).

La trombospondina, una glicoproteina rilasciata dagli α granuli delle piastrine attivate, stabilizza l'aggregazione delle PLT, formando un legame non covalente con il fibrinogeno (*Leung et al. 1985*). La trombospondina è inoltre incorporata nel coagulo di fibrina in formazione (copolimerizzazione), dove favorisce la polimerizzazione della fibrina (*Bale et al. 1985*).

Studi recenti hanno dimostrato che l'interazione delle PLT con la fibrina può essere mediata anche da vWF e GP IB. Questo legame incrementa l'entità della generazione di trombina in plasma ricco di PLT (*Beguine et al. 1997*). Si possono formare legami crociati tra

Tabella riassuntiva dei siti attivi di legame sul fibrinogeno:

LIGANDO SUL FG	SITO DI LEGAME	FUNZIONE
FXIIIa	Catena γ'	Stabilizzazione del coagulo Regolazione dell'attività del XIIIa
Trombina	Dominio E Catena γ' , Dominio E	Rilascio Fp Attività AT-I
Calcio	Catene $B\beta$ e γ (206)	Conservazione della struttura e stabilità del Fg e della Fn Promuove la polimerizzazione
Plasminogeno tPA	Catena A α (dominio αC) Catena A α (dominio αC) e γ	Promuove la fibrinolisi
α_2 -antiplasmina PAI-2 Lp(a)	Catena A α Catena A α (dominio αC) Catena A α (dominio αC)	Resistenza alla fibrinolisi
Fibronectina	Catena A α	Migliora le caratteristiche meccaniche del coagulo
Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	Catena A α e γ	Aggregazione delle PLT
Integrina Mac-1	Catena γ	Interazione con leucociti

1.10. Sintesi del fibrinogeno

Il fibrinogeno umano è prodotto da tre geni, localizzati in una regione di 50 kb sul cromosoma 4q28 in questo ordine: FGG (6 esoni 8.5kb), FGA (8 esoni 5.4kb) e FGB (10 esoni 8kb), che codificano rispettivamente la catena γ , A α , $B\beta$ (Weissebach et al. 1990, Crabtree et al. 1987). FGB è orientato in una direzione di trascrizione opposta a quella di FGG e FGA e l'espressione genica è coordinata a livello epatico (Haidaris et al. 1992, Redman et al. 2001).

L'mRNA dei 3 geni viene prodotto in quantità uguali ed oltre ad essere costitutivamente espresso a livello epatico, FGG, ma non FGA e FGB, è espresso anche in altri tessuti (Lord et al. 1989, Jacobson et al. 1993).

Il fibrinogeno di origine extraepatica ha un ruolo indipendente rispetto all'emostasi: ad es. l'importante up-regulation del Fg in corso di polmonite da P.carinii suggerisce che il Fg possa contribuire alla patogenesi della fibrosi polmonare (Hu et al. 1995, Baumhueter et al. 1988).

Il meccanismo di regolazione dell'espressione extraepatica di FGG non è stato chiarito, mentre l'espressione epatica di FGA e FGB è controllata da fattori di trascrizione epato-

specifici come HNF-1 (hepatocyte-specific nuclear factor-1)(*Dalmon et al 1993, Ritchie et al. 1982*).

Il fibrinogeno è una proteina di fase acuta (*Haidaris et al.1992*), infatti l'espressione epatica è up-regolata da IL-6 (*Nham et al. 1986*) e gli FDP possono stimolare i monociti-macrofagi circolanti a produrre IL-6 (*Huber et al. 1990, Asselta et al. 1998*). Esiste inoltre una regione glucocorticoidi-sensibile a livello dell'estremità 5' di FGB e FGG, che può mediare l'up regolazione dell'espressione del Fg (*Vasse et al. 1996, Conti et al. 1995*).

Esistono fattori che inibiscono l'espressione genica del Fg: citochine antiinfiammatorie IL-4, IL-10, IL-13 (*Hassen et al. 1992*), paradossalmente anche la citochina proinfiammatoria IL-1 β , TGF- β (*Redman et al. 2001, Okumura et al. 2002*).

1.10.1. Sintesi proteica

I sei polipeptidi che vanno a formare il Fg vengono sintetizzati a livello del reticolo endoplasmatico (*Hortin 1989*): le catene γ e i complessi A α - γ vanno ad accumularsi formando dei pool intracellulari, mentre le catene B β sono rapidamente incorporate in complessi B β - γ , poi in monomeri (A α ,B β , γ) ed infine in dimeri (A α , B β , γ).

La formazione dei complessi iniziali a due catene (A α - γ e B β - γ) è condizionata dalle metà C-terminali delle regioni coiled-coil, dai ponti disolfuro intracatena a livello delle catene B β e γ e da alcuni residui aa nella regione C terminale delle catene γ . I legami disolfuro intracatena sono inoltre importanti anche per la secrezione della molecola del fibrinogeno (*Heldin et al. 1987, Dang et al. 1989*).

1.10.2. Eterogeneità della molecola del fibrinogeno

L'eterogeneità della molecola del Fg dipende da modificazioni a vario livello durante e dopo la biosintesi: splicing alternativo dell'mRNA, solfatazione di aa, fosforilazione, vario grado di glicosilazione, proteolisi, polimorfismi genetici. Questi meccanismi sono alla base di oltre un milione di forme diverse di Fg. Questa eterogeneità può cambiare le proprietà del coagulo di Fn ed influenzare il processo di guarigione delle ferite (*Dang et al. 1989, De Maat et al. 2005, Straub et al. 1963, Takda et al. 1966*).

1.11. Alterazioni patologiche: disfibrinogenemie

Le disfibrinogenemie sono disordini della coagulazione causate da anomalie strutturali e/o funzionali del fibrinogeno che interferiscono con il ruolo emostatico della molecola. Esse possono essere congenite oppure acquisite (le più frequenti).

1.11.1. Disfibrinogenemie congenite

Le disfibrinogenemie congenite si hanno a seguito di mutazioni a carico dei geni localizzati sul cromosoma 4 che codificano per le catene del fibrinogeno. Fino ad oggi, sono state identificate fino a 245 alterazioni geniche, la maggior parte delle quali vengono ereditate con meccanismo autosomico dominante.

Di solito non sono associate a storia di sanguinamento o trombosi (il 55% dei casi è asintomatico con sole alterazioni dei test di laboratorio, come allungamento del tempo di trombina (TT), del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) e del tempo di protrombina (PT), mentre il 25% presenta sanguinamento e il 20% trombosi.

Nel 27% dei casi possono coesistere, nello stesso paziente, fenomeni emorragici e trombotici.

Le manifestazioni emorragiche, dovute alla mancata formazione del coagulo di fibrina, sono variabili per sede ed entità: epistassi, sanguinamento gengivale, menorragia, ematomi,

ematri, sanguinamento a seguito di procedure chirurgiche o parto, ritardo nella guarigione delle ferite.

Le manifestazioni trombotiche includono: trombosi venose profonde degli arti inferiori ed embolia polmonare, tromboflebiti, trombosi arteriose. La patogenesi delle manifestazioni trombotiche (figura 11) è invece meno chiara, coesistendo due ipotesi:

1. Legame poco stabile tra trombina e fibrina favorirebbe il rilascio in circolo di una maggiore quantità di trombina, responsabile di ipercoagulazione/trombosi;
2. Difetto delle proteine pro-fibrinolitiche (attivatore tissutale del plasminogeno, plasminogeno) o resistenza della fibrina all'azione della plasmina (*Gralnick et al. 1995, Ebert et al. 1994, Haverkate et al. 1995, Galanakis et al. 1993, Mosesson et al. 1999*).

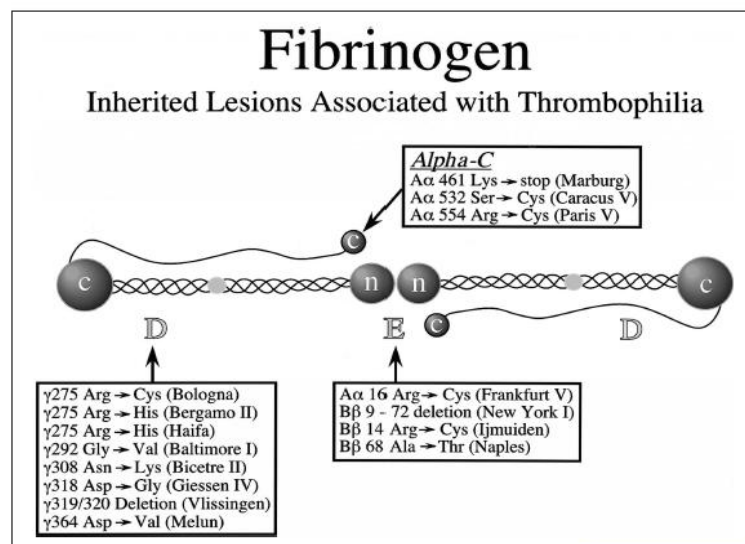


Figura 11. Schema della molecola del Fg e localizzazione delle mutazioni associate con trombofilia.

(tratto da Mark.T Cunningham, MD; John T. Brandt, MD; Michael Laposata, MD, PhD; John D.Olson, MD, PhD. *Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia Arch Pathol Lab Med* 2002)

1.11.2. Disfibrinogenemie acquisite o secondarie

Le forme secondarie di disfibrinogenemia frequentemente si associano ad alterazioni della funzionalità epatica: cirrosi, epatite cronica, insufficienza epatica acuta, tossicità da paracetamolo, cisti del coledoco, ittero ostruttivo. Un aumento dei residui di acido sialico a livello delle catene B β e γ altera la carica elettrica della molecola, ostacolando la polimerizzazione della fibrina. È difficile stabilire se e in che grado la disfibrinogenemia contribuisca alle manifestazioni emorragiche o trombotiche, dal momento che i pazienti epatopatici presentano multiple anomalie della coagulazione (deficit dei fattori vitamina K dipendenti, piastrinopenia e piastrinopatia) (*Palascak et al. 1977, Martinez et al. 1983, Mammen et al. 1994*).

La disfibrinogenemia acquisita può essere una manifestazione paraneoplastica, in presenza di tumori quali epatomi e tumori alle cellule renali (le cellule neoplastiche secernono molecole anomale di fibrinogeno); in questi casi la remissione della patologia neoplastica è accompagnata dalla risoluzione del quadro coagulativo (*Von Felton et al. 1969, Dawson et al. 1985*).

Una disfibrinogenemia acquisita può essere determinata dalla presenza di autoanticorpi diretti contro la molecola del fibrinogeno, che bloccano il clivaggio dei FpA e FpB, interferiscono con la polimerizzazione della fibrina o con il processo di cross-linking mediato dal fattore XIIIa (anche in assenza di manifestazioni cliniche). Ciò può avvenire, ad esempio, in corso di malattie del connettivo (LES), paraproteinemie (mieloma multiplo), insufficienza renale, tromboflebiti migranti, sarcoidosi trattata con isoniazide, malattie croniche del fegato, sindrome di Down (*Lobet et al. 2007, Galanakis et al. 1978, O'Kane et al. 1994, Gris et al. 1992*).

Si può avere produzione di autoanticorpi in soggetti in apparente buona salute ; le anomalie della coagulazione risultano direttamente proporzionali alla quantità di autoanticorpi presenti in circolo. La plasmaferesi risulta essere una possibilità terapeutica in questi pazienti (*Ruiz et al. 1988*).

In letteratura è riportato un caso di disfibrinogenemia autoimmune che andava incontro a remissione spontanea a seguito della formazione di nuovi autoanticorpi bloccanti gli stessi anticorpi leganti il fibrinogeno. Poiché erano assenti immunocomplessi in circolo, si

è ipotizzata la possibilità che questi autoanticorpi agissero inibendo la sintesi degli anticorpi leganti il fibrinogeno (*Ghosh et al. 1983*). Raramente possono riscontrarsi alloanticorpi diretti contro il fibrinogeno: in pazienti affetti da afibrinogenemia trattati con terapia sostitutiva con concentrati di fibrinogeno (*Ginell et al. 2013*).

Casi di disfibrinogenemia sono indotti da farmaci come mitramicina (*Ashby et al. 1986*), glucocorticoidi, isotretinoina (*Undas et al. 2011*). La glicazione delle proteine nei soggetti con diabete mellito, altera la struttura del fibrinogeno ed è anch'essa una possibile causa di disfibrinogenemia (*Dunn et al. 2005*). La disfibrinogenemia acquisita è un fattore di rischio cardiovascolare, poiché favorisce il processo aterosclerotico e le relative manifestazioni trombotiche.

1.11.3. Casi in letteratura di disfibrinogenemia associata a MGUS

In un paziente con gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS), è stata riscontrata disfibrinogenemia, dove una catena leggera λ , in forma monometrica, legava la molecola di fibrinogeno. Tale legame non alterava il rilascio dei FpA e FpB, ma andava a interferire con le fasi di formazione del coagulo subito a valle dell'azione catalitica della trombina, cioè agiva come inibitore della polimerizzazione dei monomeri di fibrina. Poiché la catena λ era legata al fibrinogeno, non veniva filtrata a livello renale con conseguenti bassi livelli di proteinuria di Bence Jones (BJP). All'elettroforesi (sia su plasma che con fibrinogeno purificato) la molecola di fibrinogeno del paziente migrava più velocemente dei controlli, inoltre si evidenziavano due bande di migrazione per la catena λ , di cui una si trovava alla stessa altezza della banda del fibrinogeno. I livelli di IgG, IgA, IgM e di catene leggere k libere erano bassi. Solo le catene leggere λ libere mostravano valori elevati, con ridotto rapporto k: λ , suggerendo una produzione monoclonale. L'alterata migrazione della molecola del fibrinogeno all'elettroforesi è imputabile al legame con la catena λ ; le due bande che si rilevano corrispondevano, una alle catene libere mentre l'altra, posta alla stessa altezza della banda del fibrinogeno, corrispondeva alle catene legate al fibrinogeno. La proprietà di interferire con la molecola di fibrinogeno è peculiare della forma monomerica della catena λ e la natura del legame tra le due molecole è di tipo non covalente. Infatti le catene λ purificate ottenute dalle urine del paziente non legavano il fibrinogeno, poiché nelle urine tali catene sono in forma dimerica. Lo studio di questo particolare caso di disfibrinogenemia è stato inoltre completato con l'analisi dell'mRNA delle catene λ del paziente, ma non è tutt'ora chiaro quale sia il sito di legame delle catene λ sul fibrinogeno. Le alterazioni del profilo coagulativo non avevano riscontro clinico (*Dear et al. 2007*).

In letteratura è presente anche un altro caso di disfibrinogenemia acquisita causata dalle catene λ . Una donna giapponese affetta da sindrome nefrosica presentava anomalie del profilo coagulativo, con quadro clinico silente e assenti BJP. All'autopsia sono stati rilevati importanti depositi di amiloidosi e probabilmente la scarsa proteinuria era dovuta sia al legame delle catene λ al fibrinogeno, sia all'incorporazione di queste catene nella formazione di fibrille di amiloide (*Undas et al. 2011*).

1.12. Test di laboratorio per lo screening delle disfibrinogenemie

I test di screening utilizzati nel laboratorio di analisi per l'identificazione clinica di eventuali disfibrinogenemie sono: tempo di trombina e tempo di reptilase.

Se questi test risultano allungati, la conferma diagnostica è data dalla misurazione dei livelli di fibrinogeno nel plasma (*Mark et al. 2002*). In letteratura è descritto un caso dove si rilevava allungamento del TT ma non del tempo di reptilase: in questo caso gli autoanticorpi del paziente andavano ad interferire con il solo rilascio del FpB, ma non del FpA (*Llobet et al. 2007*).

- Tempo di trombina (TT): è il tempo in cui una certa quantità di trombina calcica induce la formazione di un coagulo in un campione di plasma citrato. La trombina agisce direttamente sul fibrinogeno e il tempo è indipendente da tutti gli altri fattori della coagulazione. Un allungamento del TT si verifica nelle condizioni di ipo-afibrinogenemia, disfibrinogenemia congenita e acquisita, presenza di eparina, presenza di prodotti di degradazione della fibrina e del fibrinogeno (*Ohler et al. 1999*). In un solo caso è stato riscontrato un accorciamento piuttosto che un allungamento del TT in corso di disfibrinogenemia (*Ebert et al. 1994*).

- Tempo di Reptilase (TR): Tempo in cui una certa quantità di reptilase (enzima ottenuto dal veleno del serpente Bathrops) induce la formazione di un coagulo in un campione di plasma citrato. L'enzima in questione stacca solo il FpA e non il FpB, a differenza della trombina. Anche questo tempo risulta allungato in caso di disfibrinogenemia. Il test ha il vantaggio di non essere influenzato dalla presenza di eparina o da altri fattori inibenti la trombina (ad esempio fattori eparin-like, paraproteine) (*Llobet et al. 2007*).

- Studi di mixing per la valutazione del TT (1:1): In alcuni casi il TT risulta allungato, in presenza di normali livelli di fibrinogeno nel plasma (*Palascak et al. 1977*). Per stabilire se la causa dell'allungamento del TT risieda in un'anomalia funzionale del fibrinogeno viene eseguito il TT (1:1):

- è prevista una iniziale determinazione del TT su plasma del paziente a cui è stato aggiunto plasma normale (il rapporto tra i due tipi di plasma deve essere 1:1);

- in un secondo tempo si determina il TT sul plasma defibrinato del paziente a cui viene aggiunto plasma normale (anche in questo caso in un rapporto 1:1).

Nelle disfibrinogenemie il tempo di trombina risulta allungato solo nel primo test, mentre nel secondo risulterà normale, dal momento che non si ha più fibrinogeno interferente.

Nel sospetto di forme congenite (funzionalità epatica nella norma, familiarità per disturbi della coagulazione clinici o laboratoristici) può essere utile il test dell'elettroforesi per lo studio della proteina del fibrinogeno e l'analisi genetica (*Polack et al. 1984*).

1.13 Misurazione dei livelli di fibrinogeno nel plasma

(Palareti et al. 1991, NCCLS 1994)

Esistono diverse metodiche per valutare la quantità di fibrinogeno nel plasma:

- Metodo di Clauss: si basa sulla misurazione del tempo necessario alla formazione del coagulo di fibrina. Il plasma povero di piastrine è diluito 1:10 per minimizzare l'effetto di sostanze inibitorie come eparina e FDP. Si aggiunge trombina ad alte concentrazioni (100 U/ml) così da ottenere tempi di coagulazione indipendenti dalla concentrazione di trombina. Dal confronto del tempo necessario per la formazione del coagulo con i valori di una curva di calibrazione, si ricava la concentrazione del fibrinogeno nel plasma. La derivazione dei livelli di fibrinogeno sulla base del PT si ottiene valutando il PT del paziente sulla base della variazione della densità ottica ottenuta dal campione di plasma povero di piastrine del paziente, confrontato con una curva di calibrazione precedentemente ricavata (nella quale una certa densità ottica corrisponde ad una certa concentrazione di fibrinogeno nel campione), ottenendo così la concentrazione del fibrinogeno.

- Metodo immunologico: misurazione della concentrazione del fibrinogeno presente nel campione di plasma, mediante tecnica ELISA (enzyme linked immunoabsorbant assays) o mediante nefelometria. Con il metodo immunologico non viene valutata l'attività funzionale del fibrinogeno, perciò è particolarmente utile per evidenziare le disfibrinogenemie, dove esiste una discrepanza tra la quantità di fibrinogeno nel plasma e la sua attività funzionale.

- Metodo gravimetrico: si basa sul peso del coagulo di fibrina. È analogo al metodo di Clauss, con la differenza che invece di considerare il tempo di formazione del coagulo viene valutato il peso del coagulo. È un test che presenta difficoltà tecniche perciò è poco usato.

1.14 Catene leggere libere (FLC)

1.14.1. La storia

Nel novembre del 1945 il noto patologo di Londra dr. Henry Bence Jones (*Kyle et al. 1973*) ricevette una lettera da parte del dr. Thomas Watson, accompagnata da un campione di urine di un paziente che era stato seguito sia da quest'ultimo che dal Dr. William MacIntyre, affetto da "mollium ossium", con dolore osseo diffuso, fragilità ossea e predisposizione alle fratture.

Nella lettera si chiedeva al dr. Bence Jones:

"Caro Dott. Bence Jones, il vasetto contiene un'urina di elevato peso specifico. Quando viene bollita diventa molto opaco. In aggiunta di acido nitrico, diventa effervescente, assume una colorazione rossastra, e diviene abbastanza chiaro, ma come si raffredda assume la consistenza e l'aspetto che vedete. Che cosa è?" (Kyle et al 1982, Solomon et al 1982)

Il campione era stato inviato in quanto ai test chimico-fisici del tempo aveva mostrato un comportamento sconosciuto, ovvero, il precipitato dell'albumina trovato con il riscaldamento delle urine, in modo anomalo si risolubilizzava quando era riscaldato a 75°C. Il paziente in osservazione dopo qualche mese peggiorò e morì l'anno seguente. Nel 1847 il dr. Bence Jones, pubblicò due articoli sul giornale "The Lancet" riguardo al caso e descrisse le particolari caratteristiche chimico-fisiche del campione di urine, ipotizzando che fossero da attribuire ad una proteina anomala, un deutossido idrato di albume, e suggeriva di ricercare questa proteina nei pazienti affetti da "mollium ossium" (*Kyle et al. 1982*). In seguito, la proteina anomala da lui descritta prese il suo nome: proteina di Bence Jones (BJP). Nel 1909, erano stati riportati più di 40 casi clinici (*Groop et al. 1990*) in cui si ritrovava la proteina BJP, e scienziati come Parkers e Weber, insieme a Ledingham, evidenziarono che queste proteine originavano da plasmacellule del midollo osseo. Nel 1922, Bayne-Jones e Wilson caratterizzarono due tipi di proteina di Bence Jones (gruppo I e gruppo II) tramite l'osservazione di una precipitazione effettuata con antisieri, ottenuti da coniglio immunizzato, nei campioni di urine di molti pazienti.

In seguito nel 1956, mediante la tecnica dell'immunodiffusione, Kormgold e Lapiri dimostrarono che gli antisieri contro i due diversi gruppi individuati, reagivano anche contro

le proteine del mieloma. Come tributo per questa osservazione ai due scienziati, fu attribuito il nome di catene κ e catene λ ai due gruppi (I e II) che erano stati differenziati nel 1922. Nel 1962, Edelman e Gally dimostrarono che le catene leggere libere preparate da IgG monoclonali erano le stesse delle proteine di Bence Jones ma solo nel 1975 si effettuò con successo la prima misurazione di catene leggere libere, tramite una separazione cromatografica su colonna (*Brawell et al. 2001*). Questa metodica permise di separare le catene leggere libere dalle immunoglobuline complete ma non si dimostrò una pratica di semplice uso routinario, di conseguenza si focalizzò l'attenzione sull'uso di antisieri specifici diretti contro epitopi "nascosti" sulle catene leggere libere. Questi epitopi si trovavano a livello dell'interfaccia tra catena leggera e pesante delle immunoglobuline, e si rivelavano una volta distaccatisi. Per l'analisi dei campioni delle urine venivano utilizzati il metodo radioimmunologico ed immunoenzimatico tramite antisieri policlonali ma la specificità di questi rimane inadeguata per dosaggi su campioni di siero (*Bradwell et al. 2001, Katzmann et al. 1998*).

L'uso di anticorpi monoclonali, in seguito, fu sviluppato per migliorare la specificità dei metodi ma reagenti soddisfacenti non erano disponibili (*Ling et al. 1983, Axiak et al. 1987*) ed il loro uso era ristretto a metodi radioimmunologici e immunoenzimatici.

Vennero fatti tentativi per sviluppare il metodo turbidimetrico (*Tillyer et al. 1991*), migliorare il saggio nefelometrico (*Wakasugi et al. 1995*), usando anticorpi policlonali ma questi non permettevano una rivelazione sensibile delle catene leggere libere: si verificava una cross-reazione con le immunoglobuline intatte. Solo nel 2001, è stato sviluppato un saggio immunologico basato sull'uso di anticorpi policlonali in grado di dosare le catene leggere in concentrazioni normali nel siero (*Bradwell et al. 2001*); la sua utilità fu evidente quando catene leggere monoclonali furono dosate nel siero di pazienti classificati come affetti da "mieloma non-secrente" (*Drayson et al. 2001*).

Furono evidenziati valori elevati di catene leggere libere sieriche in pazienti con mieloma multiplo e proteinuria di Bence Jones.

1.14.2. Struttura delle immunoglobuline

Le molecole anticorpali hanno una duplice simmetria e sono composte da due catene pesanti identiche (Catena H=Heavy) e due catene leggere identiche (Catena L=Light) (Figura 12). Le due catene pesanti sono legate tra loro da alcuni legami disolfuro, e un altro ponte disolfuro lega ciascuna catena leggera alla pesante. Ogni catena è costituita da due domini, uno variabile e uno costante. I domini variabili di ciascuna catena (pesante e leggera) si combinano fra loro a formare un sito di legame specifico per l'antigene (FAB= Fragment Antigen Binding), contribuendo entrambi a sviluppare la specificità dell'anticorpo. Invece i domini costanti di entrambi le catene, si combinano a formare il sito funzionale della molecola anticorpale (FC= Frammento Cristallizzabile).

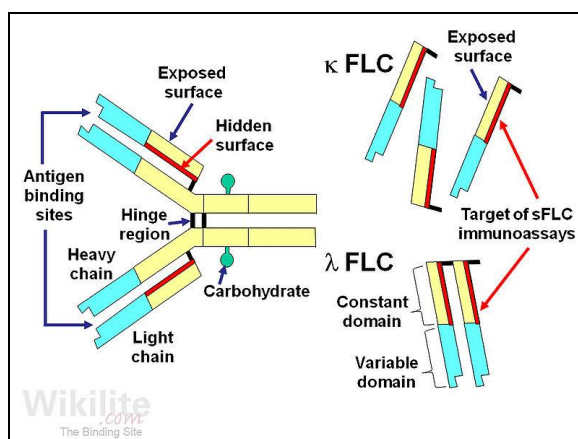


Figura 12. Una molecola di immunoglobulina costituita da catena L e H, e, a destra, catene leggere libere κ e λ

(tratto da Wikilite.com the binding site)

La classe dell'anticorpo, e quindi la sua funzionalità, sono definite dalla catena pesante che può avere cinque varianti. Le principali classi di immunoglobuline infatti sono corrispondenti al tipo di catena pesante che possiedono (IgM, IgG, IgD, IgE e IgA). Negli anticorpi si trovano due tipi di catene leggere, denominati lambda (λ) e kappa (κ), e una data immunoglobulina possiede una delle due ma non entrambi.

1.14.3. Le catene leggere e pesanti delle immunoglobuline sono costituite di regioni costanti e variabili

È stato definito che ogni catena consiste di una serie di sequenze simili, anche se non identiche, ciascuna lunga circa 110 aa.: ognuna di queste regioni ripetitive corrisponde ad una regione distinta della proteina, ripiegata in modo compatto, nota come dominio proteico. La catena leggera è costituita da due di questi domini immunoglobulinici, mentre la catena pesante è costituita da quattro di questi. Inoltre, si osserva che queste sequenze amminoacidiche hanno una grande variabilità in corrispondenza della porzione N-terminale di entrambe le catene. La variabilità è limitata ai primi 110 aa., corrispondenti al primo dominio, mentre gli altri domini sono costanti. I domini variabili V di catene leggere e pesanti (Vh e Vl) formano insieme la regione V dell'anticorpo che conferisce la capacità di legare uno specifico antigene, mentre i domini costanti C (Ch e Cl) formano la regione C.

Questi domini proteici si associano a formare domini globulari più complessi. Completamente assemblata la molecola comprende tre porzioni globulari di dimensioni comparabili, collegate da una regione flessibile costituita da una catena polipeptidica, detta regione cerniera. Ciascun braccio della struttura a forma di Y è costituito dall'associazione di una catena leggera con la metà ammino-terminale di una pesante, mentre lo stelo di Y è composto dalle due metà carbossi-terminali appaiate delle catene pesanti. L'associazione è fatta in modo che i domini Vh e Vl si fronteggino, così come i domini Cl e Ch1; da quest'associazione origina il frammento FAB. L'appaiamento fra le due porzioni C-terminali delle due catene pesanti (Ch2-Ch3), vanno a costituire il FC.

1.14.4. Struttura della catena leggera

Ogni catena leggera libera si avvolge a formare un dominio costante e un dominio variabile. Ciascun dominio è formato da due foglietti (sheets), che sono elementi di una struttura proteica costituiti da filamenti della catena polipeptidica impaccati tra loro (filamenti o strand). I foglietti sono legati tra loro da legami disolfuro e formano una struttura dalla forma "a barile" nota come barrel (Figura 13).

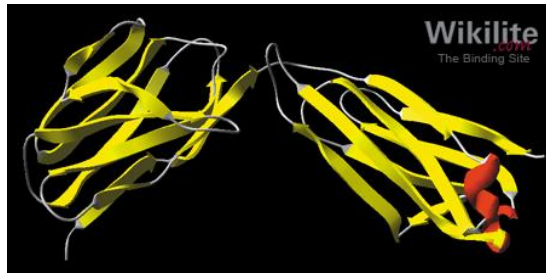


Figura 13. Una FLC-k che mostra la regione costante (sx) e la regione variabile (dx)
(tratto da Wikilite.com the binding site)

Ogni molecola di catena leggera libera è caratterizzata da un dominio N-terminale che contiene la regione variabile (VL) e da un dominio C-terminale che contiene la regione costante (CL). Questi domini sono legati tramite un segmento di legame (codificato dal gene J da joining). La variabilità della sequenza, tuttavia, non è distribuita uniformemente lungo la regione V ma è concentrata in alcuni tratti, definiti come regioni ipervariabili, sia per le catene leggere che per le catene pesanti. I tratti interconnessi tra le regioni ipervariabili si chiamano regioni cornice ed hanno una minore variabilità. Quando i domini Vh e Vl sono appaiati nella molecola dell'anticorpo, le anse ipervariabili dei due domini si trovano vicine, creando un sito singolo di ipervariabilità sulla sommità di ciascun braccio della molecola, che è il sito di legame per l'antigene. Le sei anse ipervariabili, determinano la specificità per l'antigene e sono dette regioni che determinano complementarità (CDR).

1.14.5. Sintesi delle catene leggere

Le immunoglobuline sono prodotte e rilasciate in circolo dalle plasmacellule. L'intera sequenza della regione V della catena pesante e leggera, è codificata da più segmenti genici. Il dominio V della catena leggera è codificato da due segmenti separati di DNA: il primo codifica per i primi 95-101 aa ed è chiamato segmento variabile (o segmento genico V), il secondo codifica per i circa 13 aa rimanenti ed è chiamato segmento di legame (o segmento genico J) (Figura 14).

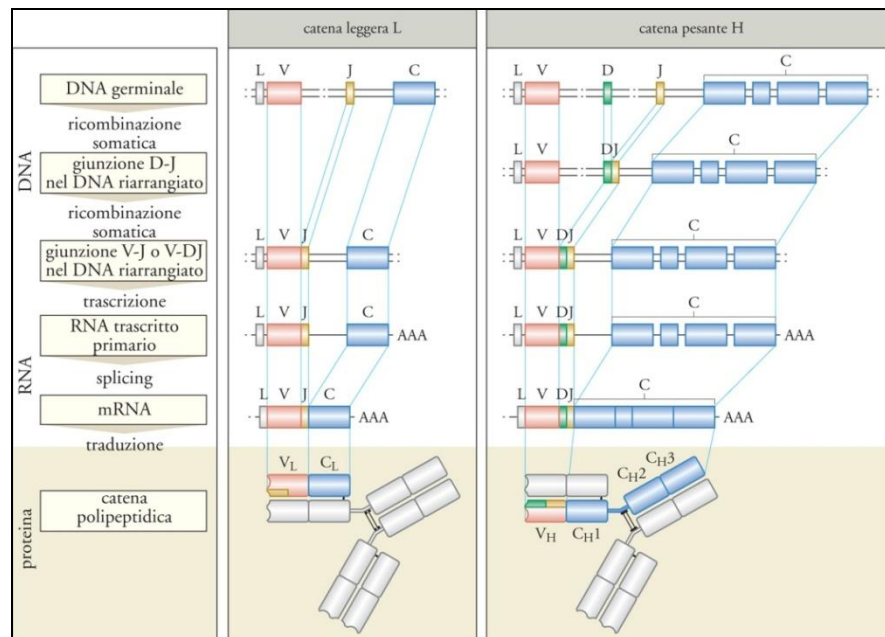


Figura 14: L'unione dei segmenti genici V e J crea un esone che codifica per l'intera regione V della catena leggera. Nel DNA non riarrangiato i segmenti genici V sono localizzati piuttosto lontano dalla regione C. i segmenti genici J sono invece vicini alla regione C, quindi l'unione di un segmento V con un segmento genico J, porta il segmento V vicino a quello C

Si ha un primo riarrangiamento V-J, a seguito della rimozione degli introni fra V e J con riarrangiamento del DNA. In seguito si ha la rimozione degli introni fra l'esone V-J formatosi e la regione C, così da avere il secondo riarrangiamento. In questa fase si produce il trascritto primario di RNA che in seguito è tradotto a formare la catena leggera polipeptidica. Questo meccanismo di riarrangiamento fra i vari segmenti genici, conferisce specificità alla catena leggera risultante, in quanto sappiamo che per ogni segmento genico esistono più variabili. Al momento del riarrangiamento una sola delle variabili del segmento genico V o J si va a ricombinare, determinando ogni volta associazioni diverse. Per quanto riguarda il locus delle catene leggere, localizzato sul cromosoma 22, il gruppo costituito da segmenti genici V è seguito da quattro segmenti genici J, ciascuno legato ad un singolo gene C. Nel locus delle catene leggere k presente nel cromosoma 2, l'insieme dei segmenti genetici V_k è seguito da un gruppo di segmenti genici J_k e da un solo gene C_k (Figura 15). Con questo possiamo spiegare a cosa sia dovuta la vastità del repertorio anticorpale che possediamo.

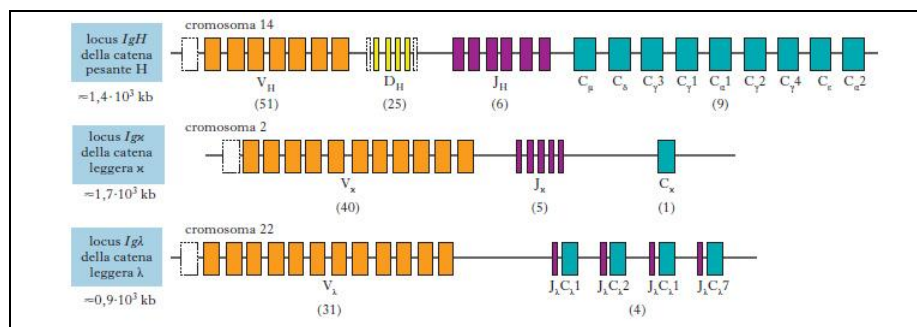


Figura 15: Le catene leggere libere prodotte vengono unite alle catene pesanti a formare le immunoglobuline durante lo sviluppo dei linfociti B e vengono espresse inizialmente sulla superficie delle cellule pre-B. Con il procedere della maturazione, si staccano dalla superficie delle cellule B e sono rilasciate in circolo

1.14.6. Metabolismo delle catene leggere libere

Le catene leggere libere, al pari delle immunoglobuline, sono prodotte e immesse in circolo dalle plasmacellule. Negli individui normali, approssimativamente sono prodotte 500 mg di catene leggere libere dalle plasmacellule contenute nel midollo osseo e dalle cellule dei linfonodi (*Salomon et al. 1985, Waldmann et al. 1972*). Normalmente il contenuto in plasmacellule del midollo osseo è di circa l'1%, mentre in situazioni patologiche come mieloma multiplo ad esempio, arriva al 90%. In caso di infezioni croniche e malattie autoimmuni il midollo potrebbe contenere 5-10% di plasmacellule e queste condizioni corrispondono ad un incremento patologico di catene leggere libere ematiche.

Le molecole entrano nel circolo ematico e sono rapidamente distribuite tra il compartimento intravascolare ed extravascolare. La produzione di catene leggere libere, non incorporate nelle immunoglobuline complete, è di circa 170 mg/24h (110 mg/ 24h per le κ e 60 mg/ 24h per le λ) ed il loro catabolismo avviene quasi interamente nel rene.

La concentrazione di queste, nel sangue del soggetto normale, è molto bassa pur essendo rilevante la quantità immessa nel circolo; infatti per il basso peso molecolare (22 kDa per il monomero) passano rapidamente nel filtrato glomerulare. Altrettanto bassa è la concentrazione nelle urine, in quanto le catene leggere libere presenti nel filtrato glomerulare sono riassorbite e catabolizzate nel tubulo prossimale.

1.14.7. Clearance renale

Nel soggetto normale le catene leggere libere sono rapidamente metabolizzate nel rene, in modo variabile rispetto al loro peso molecolare. Le catene leggere monomeriche (22 kDa) sono eliminate in 2-4 ore al 40% della filtrazione renale, mentre catene leggere dimeriche (44 kDa) sono filtrate in 3-6 ore al 20% del filtrato glomerulare. Polimeri più grandi come forme trimeriche (circa 88 kDa), sono filtrati più lentamente. In condizioni patologiche, come per pazienti affetti da mieloma multiplo la rimozione di queste potrebbe prolungarsi a 2-3 giorni (*Miettinen et al. 1967*). Nell'individuo normale sono escrete 1-10 mg di catene leggere libere al giorno nell'urina, nonostante vengano rilasciate nel circolo ematico circa 500 mg. Questo perché le catene leggere filtrano facilmente attraverso il glomerulo renale e sono riassorbite dal tubulo prossimale, dove vengono catabolizzate ad aminoacidi. L'esatta origine del sito di passaggio renale non è chiara ma probabilmente le catene leggere entrano nell'urina tramite la superficie mucosa della parte distale del nefrone e dell'uretra, lungo il sito di secrezione delle IgA. Se il tubulo prossimale del nefrone è danneggiato o/e stressato, le catene leggere libere filtrate non sono completamente metabolizzate e una piccola parte probabilmente entra nell'urina, così da rappresentare un importante marker di funzionalità renale.

1.14.8. Emivita di immunoglobuline (Ig) e di catene leggere libere (FLC)

L'emivita delle IgG è di 21 giorni per le IgG1, IgG2 e IgG4, e di 7-9 giorni per le IgG3, delle IgA è 6 giorni e quella delle IgM è di 5 giorni, mentre l'emivita delle FLC è di circa 1 h. Da qui possiamo dedurre che le Ig del siero sono l'espressione della produzione plasmacellulare di diversi giorni, approssimativamente 15 gg, mentre le catene leggere libere urinarie del soggetto normale (o con filtrato glomerulare normale) sono l'espressione della produzione plasmacellulare verificatasi durante il periodo di stazionamento in vescica dell'urina o durante il periodo della raccolta. Sembra dimostrato che solo pochi cloni sono contemporaneamente attivi nel produrre Ig e FLC, e pertanto nel soggetto normale la "produzione istantanea" di Ig e di FLC sarebbe "oligoclonale". Se è vera questa ipotesi, data l'emivita di Ig e di FLC, le Ig risultano policlonali all'elettroforesi del siero e delle urine perché sono l'espressione della produzione dei cloni di almeno 15 giorni, mentre le FLC possono

risultare oligoclonali all'EF delle urine perché espressione della produzione avvenuta durante la raccolta.

1.14.9. Alterazioni del metabolismo delle catene leggere libere

Una volta definita la struttura ed individuato il luogo, il meccanismo di produzione e di eliminazione delle FLC possiamo schematizzare cosa avviene nel caso di incremento di produzione o diminuzione di catabolismo.

Nel caso di un aumento di produzione delle FLC, che può essere ricondotto ad un aumento del numero di cellule produttrici, si può avere:

- incremento della quantità di FLC immesse in circolo tale però da non determinare aumento della concentrazione ematica di FLC, fino a quando il filtrato glomerulare non scende sotto i 30 ml/min, poiché le FLC passano liberamente il filtro glomerulare;
- incremento della quantità di FLC nel filtrato glomerulare;
- incremento della quantità di FLC riassorbita dal tubulo;
- se la quantità di FLC nel filtrato glomerulare supera la capacità attuale di riassorbimento del tubulo, le FLC non riassorbite verranno eliminate con l'urina;
- se la quantità di FLC riassorbite dalla cellula tubulare supera la capacità catabolica della stessa cellula si avrà accumulo di FLC e conseguente sofferenza cellulare.

Il deficit tubulare secondario al sovraccarico determina la chiusura del circolo vizioso; la nefrotossicità delle FLC sembra essere più legata alla qualità che alla quantità; vi sono pazienti che eliminano piccole quantità di BJP (FLC nell'urina) ed mostrano rapida ed irreversibile compromissione renale; altri eliminano importante quantità di BJP per anni, senza evidenziare danni renali.

In sintesi:

- l'incremento della quantità di FLC in circolo determina sovraccarico tubulare e conseguente proteinuria con danno tubulare finale.

Nel caso di diminuzione del catabolismo delle FLC, che può essere ricondotto ad un deficit del riassorbimento tubulare delle FLC per insufficienza tubulare primitiva oppure insufficienza tubulare secondaria a sovraccarico di FLC o di altre sostanze (aminoacidi, farmaci, ecc.), si può avere:

- una normale quantità di FLC in circolo e quindi nel filtrato glomerulare;

- una riduzione della quantità di FLC riassorbite dal Tubulo ed eliminazione nell'urina delle FLC non riassorbite.

Perché si possa determinare un aumento della concentrazione ematica di FLC è necessario che si determini un'insufficiente filtrazione glomerulare rispetto al carico di FLC. Pertanto:

-se aumenta la sintesi di FLC, a meno che tale aumento non sia imponente, la concentrazione ematica non subirà rilevanti variazioni finché il filtrato glomerulare è sufficiente.

- anche nel soggetto normale è presente in circolo una piccola quantità di FLC per cui una riduzione del filtrato glomerulare determinerà un aumento della concentrazione di FLC nel sangue.

In effetti, in pazienti con filtrato glomerulare inferiore a 5-10 ml/min e senza presumibile aumento della sintesi di FLC, la concentrazione di FLC nel sangue risulta dalle 5 alle 8 volte superiore a quella del soggetto normale. Al contrario, pazienti con mieloma micromolecolare e imponente BJP, superiore a 400 mg/dl (4600 mg/24h), possono presentare una concentrazione sierica di FLC normale (*Solling et al. 1981*).

Cause che determinano aumento di concentrazione delle FLC, nelle urine :

1. Aumento della sintesi e conseguente aumento nel filtrato glomerulare, tale da superare la capacità di riassorbimento del tubulo prossimale:

- se l'aumento di sintesi è monoclonale o oligoclonale avremo nelle urine rispettivamente FLC, monoclonali o oligoclonali;
- se l'aumento di sintesi è policlonale avremo nelle urine FLC policlonali.

2. Riduzione del riassorbimento specifico del tubulo prossimale per:

- interferenza e competizione di altre sostanze presenti nel filtrato glomerulare (Es. aminoacidi tipo arginina, lisina, ecc., farmaci, ecc.)
- ridotta funzionalità a seguito di danno tubulare.

In entrambi i casi le FLC, nelle urine rispecchieranno il tipo di produzione.

3. Combinazione delle due situazioni suddette.

1.15. Tecniche di studio delle catene leggere libere

Le tecniche di routine disponibili oggi in laboratorio consentono di accertare alcune delle possibili varianti e anomalie delle proteine, considerandone tre aspetti fondamentali: qualità, concentrazione e funzione. Per quanto riguarda la qualità ma anche la concentrazione, nello studio delle varianti e anomalie delle proteine (soprattutto delle immunoglobuline), è necessario analizzare la loro individualità antigenica ma anche la loro mobilità elettroforetica. Da questa considerazione dobbiamo dedurre che una tecnica di studio come l'elettroforesi (EF), solo separativa, è in grado di evidenziare la distribuzione delle frazioni del campione in esame rispetto al corrispondente campione "normale", ma non la "composizione" delle frazioni rispetto al campione "normale". Mentre una tecnica solo immunologica come l'immunoprecipitazione in fase liquida (IPL), è in grado di evidenziare l'individualità antigenica del campione e la sua quantità, ma non la distribuzione della proteina. Di conseguenza, per valutare varianti e anomalie proteiche come per valutare la concentrazione delle singole proteine presenti in una frazione, dobbiamo prevedere l'uso combinato di tecniche separative e tecniche immunologiche.

Lo studio delle catene leggere libere (e delle Ig) per la loro eterogeneità, è più complesso rispetto a quello di altre proteine. Abbiamo parlato dei limiti che le tecniche separative ed immunologiche possono avere singolarmente e della necessità di ricorrere all'uso combinato di queste due tecniche. Per studiare le possibili anomalie delle FLC dobbiamo valutare i parametri di qualità (composizione della FLC), indagata con tecniche immunologiche, mobilità elettroforetica (se di natura monoclonale, oligoclonale, policlonale) indagata con tecniche elettroforetiche e di concentrazione, indagata con l'elettroforesi (EF) o con IPL diretta o indiretta; la verifica contemporanea di questi parametri deve essere valutata con un metodo che sia al tempo stesso elettroforetico ed immunologico (immuno-elettroforesi e/o immunofissazione).

Un test ideale per la ricerca delle FLC dovrebbe essere:

- saggio diagnostico sensibile (identifica tutti i pazienti che producono catene leggere libere monoclonali);
- quantitativo (per le FLC e per le frazioni κ/λ per monitorare il paziente);
- alta specificità (non risentire delle interferenze da parte delle catene leggere legate);

- poco costoso e facile da effettuare;
- riproducibile su più strumenti automatizzati diversi.

L'approccio diagnostico alle discrasie plasma cellulari ad oggi, prevede l'utilizzo di elettroforesi, immunofissazione sierica e FLC sieriche (*Dispenzieri et al. 2009*):

La separazione elettroforetica delle proteine sieriche (EF) solitamente utilizzata nella routine, può essere eseguita su supporto solido (agarosio) oppure con tecnica capillare. In entrambi i casi il tracciato può mettere in evidenza la possibile presenza di una banda monoclonale la cui presenza deve essere accerta mediante immunofissazione.

In caso di presenza o sospetto di componente monoclonale (CM) all'elettroforesi, è necessario eseguire l'immunotipizzazione della CM, mediante immunofissazione (IFE) per confermare la presenza della CM e caratterizzarla immunologicamente, ovvero determinare quali catene, pesanti e leggere, costituiscono l'Ig monoclonale rilevata sul tracciato. La tipizzazione delle CM del siero mediante IFE avviene su lastre di gel di agarosio e si basa sulla loro immunoprecipitazione indotta da anticorpi specifici rivolti contro i differenti isotipi delle catene leggere e pesanti dell'Ig monoclonale dopo separazione elettroforetica.

Per il dosaggio delle FLC potevano essere seguite due strade: produzione di un antisiero policlonale dotato di elevata specificità oppure produzione di un reattivo costituito da anticorpi monoclonali. Entrambe le possibilità sono state saggiate. La produzione di anticorpi monoclonali inizialmente non ha dato i risultati sperati. Si è invece riusciti a produrre un antisiero policlonale dotato di sufficiente specificità per le catene leggere libere (vedi materiali e metodi) che è stato commercializzato dal 2001.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del nostro studio è stato quello di indagare la causa della disfibrinogenemia acquisita riscontrata in un paziente di 65 anni, clinicamente asintomatico, che presentava quadro coagulativo anomalo e non valutabile per incoagulabilità dei tempi ai comuni test emocoagulativi, e nel quale era stata esclusa la presenza di un anticorpo diretto contro il fibrinogeno. Nonostante il tracciato elettroforetico non evidenziasse alcun picco monoclonale, veniva deciso di richiedere l'immunofissazione nel siero che risultava negativa anche se il dosaggio delle FLC rivelava un aumento delle FLC-k. Dalla letteratura veniva suggerita la possibilità che potesse essere presente una componente monoclonale capace di interferire con la funzionalità del fibrinogeno. Ci siamo pertanto proposti di esplorare questa possibilità quale plausibile spiegazione della incoagulabilità in vitro in questo paziente. Dalle prime indagini è emersa la presenza di una FLC-k diretta contro il fibrinogeno e quindi abbiamo ulteriormente indagato l'interazione tra questa e il fibrinogeno del paziente e valutata la riproducibilità del legame tra la FLC-k e molecole di fibrinogeno diverse da quelle del paziente stesso.

Abbiamo utilizzato come controllo, potenzialmente patologico, un gruppo di 20 pazienti con diagnosi di mieloma multiplo ed in quattro di essi è stato riscontrato un tempo di trombina allungato. L'estensione delle indagini di immunofissazione e prove di mixing in questi pazienti era volta ad evidenziare una possibile interferenza funzionale della loro componente monoclonale con la molecola di fibrinogeno che potesse giustificare l'allungamento del TT.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI E CONTROLLI SANI

3.1.1 Paziente del caso clinico in studio

Il caso clinico in studio è un paziente di sesso maschile L.P. di 65 anni, i cui esami eseguiti in regime di pre-ospedalizzazione (10/12/2012), in previsione di intervento chirurgico per nodulo tiroideo, mostravano anomalie del profilo emocoagulativo, in assenza di alcuna manifestazione clinica correlata; gli stessi accertamenti effettuati un anno prima risultavano invece nel range di normalità. Il paziente veniva perciò inviato in altra sede per un'adeguata valutazione del quadro coagulativo. Gli esami svolti presso tale sede, in data 10/12/2013, mostravano tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), fibrinogeno coagulativo (Fgc) anomali o non valutabili, con tempo di trombina (TT) = 60 sec (V.N.= 10,3-16,6 sec), LAC negativo, Fg immunologico = 373 mg/dl (V.N. = 150-400 mg/dl). Venivano quindi eseguiti ulteriori dosaggi emocoagulativi, risultati tutti nella norma (riportati in tabella 1).

TIPO DI ESAME	RISULTATO	V.N.
FII	131%	Vn 70-130%
FV	103.9%	Vn 65-130%
FVII	120.2%	Vn 65-140%
FX	97.9%	Vn 70-120%
FVIII	102.2%	Vn 60-150%
FvW Ag	116%	Vn 50-150%
FvW cof.ristocetnico	85.9%	Vn 50-150%
FIX	99.0%	Vn 60-130%
FXI	93.6%	Vn 65-120%
FXII	101.6%	Vn 70-130%
Aggr.PLT ADP 2µM	100%	Vn 52-100%
Aggr.PLT ADP 10µM	100%	Vn 64-100%
Aggr.PLT Ac.arachidonico 1Mm	100%	Vn 70-100%
Aggr.PLT collagene 2µg/mL	100%	Vn 58-100%
Aggr.PLT ristocetina 1.5mg/MI	100%	Vn 79-100%
Aggr.PLT epinefrina 5Mm	100%	Vn 64-100%

Tabella 1. Prospetto dei test emocoagulativi del paziente in studio eseguiti quale approfondimento per il riscontro di alterazioni nello screening test.

In seguito in data 19/02/2013 veniva fatta diagnosi di disfibrinogenemia acquisita sostenuta da una possibile inibizione delle funzionalità del fibrinogeno da parte di un autoanticorpo. Veniva iniziato di conseguenza, un trattamento con infusione endovenosa di immunoglobuline di classe G ad alte dosi ma in mancanza di un'adeguata risposta, veniva consigliata una terapia che prevedeva Prednisone (Deltacortene) 1mg/Kg/die per 4 settimane.

Il paziente giungeva infine nel mese di aprile 2013 presso l'U.O. Ematologia universitaria dell'A.U.O. Pisana. Venivano valutati il profilo emocoagulativo, il livello di catene leggere libere kappa e lambda, l'immunofissazione su siero e su plasma, esami svolti presso il nostro laboratorio di Patologia Clinica ed utilizzati per il nostro studio.

3.1.2 Gruppo di controllo di pazienti con componente monoclonale

Il gruppo di controllo consisteva in 20 pazienti con diagnosi accertata di Mieloma Multiplo (MM) seguiti presso l'U.O. Ematologia universitaria dell'A.U.O. Pisana, dei quali è stato valutato il profilo emocoagulativo ed è stato effettuato il dosaggio delle catene leggere libere kappa e lambda. Nella tabella 2 sottostante sono riportate le caratteristiche generali dei controlli con malattia.

PAZIENTI	SESSO	ETÀ	DIAGNOSI
Caso 1	F	64	IgA-k
Caso 2	M	84	IgA-k
Caso 3	M	71	IgG-λ
Caso 4	F	83	IgA-k
Caso 5	F	51	IgG-k
Caso 6	F	75	IgG-λ
Caso 7	M	64	Microm-λ
Caso 8	F	59	IgG-k
Caso 9	M	62	IgG-λ
Caso 10	F	81	Microm-k
Caso 11	F	53	IgG k
Caso 12	M	62	IgG-k
Caso 13	M	62	IgG-λ
Caso 14	M	64	IgG-k
Caso 15	M	74	IgG-k
Caso 16	F	74	IgG-k
Caso 17	F	72	Microm k
Caso 18	F	70	IgG-k
Caso 19	M	67	IgG-k
Caso 20	M	76	IgG-λ

Tabella 2: Caratteristiche dei pazienti di controllo con diagnosi di MM.

3.1.3 Gruppo di controllo di soggetti sani

E' stato preso in considerazione anche un gruppo di controlli normali, costituito da quattro pazienti sani, dei quali è stato valutato il profilo coagulativo. Nella tabella 3 sottostante sono riportate le caratteristiche generali dei controlli sani.

NUMERO CONTROLLO	ETÀ	SESSO
1	53	F
2	34	F
3	28	M
4	62	M

Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti di controllo sani.

3.2 METODI

3.2.1 Metodo di dosaggio del fibrinogeno coagulativo secondo Clauss (Fgc)

Per la determinazione quantitativa del fibrinogeno è stato utilizzato il kit Fibrinogen-C XL[®] sul sistema analitico ACL TOP500 CTS IL[®].

Il principio del test si basa sul metodo originariamente descritto da Clauss: in presenza di un eccesso di trombina, il fibrinogeno viene trasformato in fibrina ed il tempo di formazione del coagulo è inversamente proporzionale alla concentrazione di fibrinogeno presente nel campione di plasma.

Il campione su cui è stato effettuato il dosaggio è stato prelevato mediante puntura venosa atraumatica utilizzando provette di plastica sottovuoto contenenti citrato trisodico al 3,8 %. Il plasma è stato ottenuto dopo centrifugazione a 3500 RPM per 10 minuti.

3.2.2 Metodo di dosaggio del tempo di protrombina (PT)

Il test per la determinazione del tempo di protrombina (PT) nel plasma umano citratato è stato effettuato con il kit RecombiPlasTin 2G[®], sul sistema di coagulazione ACLTOP500 CTS IL[®]. Il metodo prevede l'utilizzo del reagente tromboplastina contenuto nel kit, una preparazione liposomica che contiene fattore tissutale ricombinante (RTF) umano, rilipidato in una miscela sintetica di fosfolipidi con aggiunta di cloruro di calcio. Incubando il plasma in esame con una quantità ottimale di tromboplastina ed ioni calcio, si attiva la coagulazione e viene determinato il tempo di formazione del coagulo tramite da una curva di calibrazione che stabilisce una correlazione tra la quantità di fibrinogeno contenuta nel campione e la luce diffusa durante il processo di formazione del coagulo (figura 16). Il campione su cui è stato effettuato il dosaggio è stato prelevato mediante puntura venosa atraumatica utilizzando provette di plastica sottovuoto contenenti citrato trisodico al 3,8 %. Il plasma è stato ottenuto dopo centrifugazione a 3500 RPM per 10 minuti.

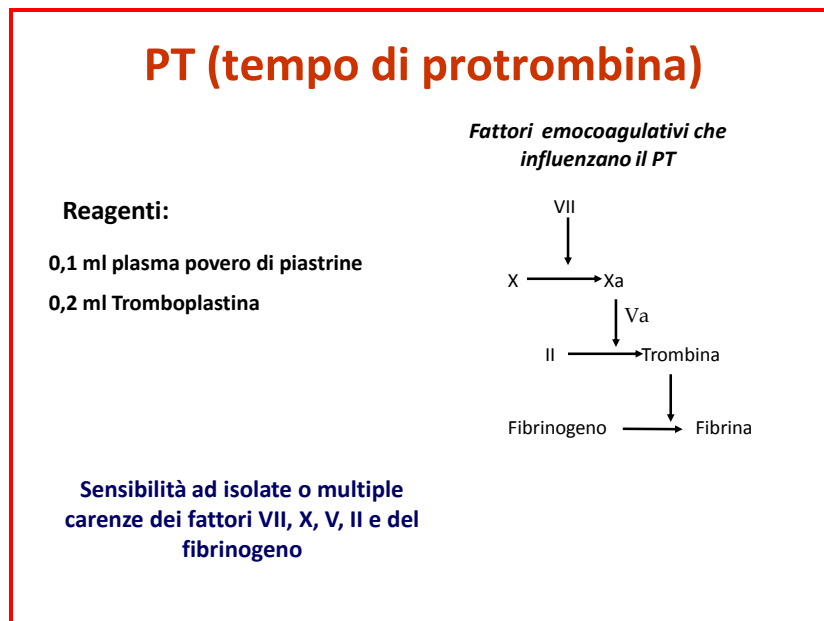


Figura 16. Schema della procedura del tempo di protrombina.

3.2.3 Metodo di determinazione del tempo di trombina (TT)

Il test per la determinazione quantitativa del tempo di trombina è stato effettuato con il kit Thrombin Time® sul sistema di coagulazione ACLTOP500 CTS IL®.

Il principio su cui si basa il test prevede che il fibrinogeno presente nel plasma in esame si trasformi in fibrina e che il tempo di formazione del coagulo venga misurato a partire dall'aggiunta del reagente trombina bovina purificata. Il campione su cui è stato effettuato il dosaggio è stato prelevato mediante puntura venosa atraumatica utilizzando provette di plastica sottovuoto contenenti citrato trisodico al 3,8 %. Il plasma è stato ottenuto dopo centrifugazione a 3500 RPM per 10 minuti.

3.2.4. Metodo di dosaggio del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT)

Il test utilizzato per la determinazione del tempo di trombina parziale attivata (aPTT) è stato effettuato con il kit SynthASil® sul sistema di coagulazione ACLTOP500 CTS IL®. Il principio del metodo prevede l'incubazione del plasma in esame con una quantità ottimale di fosfolipidi, di un attivatore da contatto carico negativamente e di una soluzione tampone, così da permettere l'attivazione della via intrinseca della coagulazione. Questa fase di attivazione avviene a 37 °C per un periodo di tempo definito ed il tempo di formazione del coagulo viene misurato a partire dall'aggiunta del calcio (figura 17). Il reagente aPTT contenuto nel kit è un prodotto liquido tamponato che contiene fosfolipidi sintetici come sostituto piastrinico e una silice colloidale a ridotta sedimentazione per un'ottimale attivazione della fase di contatto della coagulazione. Il campione su cui è stato effettuato il dosaggio è stato prelevato mediante puntura venosa atraumatica utilizzando provette di plastica sottovuoto contenenti citrato trisodico al 3,8 %. Il plasma è stato ottenuto dopo centrifugazione a 3500 RPM per 10 minuti.

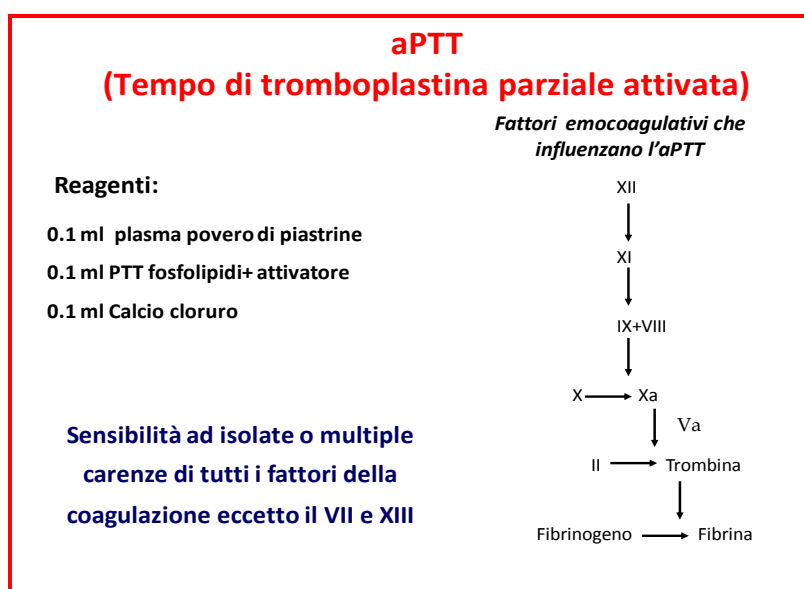


Figura 17. Schema della procedura del tempo di tromboplastina parziale attivata.

3.2.5. Mixing test: dosaggi del Fibrinogeno coagulativo (Fgc) del paziente in esame con aggiunta di pool di plasmi normali (PPN) a tempi e temperature diverse

Abbiamo dosato il fibrinogeno del paziente e successivamente abbiamo diluito il plasma del paziente in studio 1:1 con pool di plasmi normali (PPN). Infine abbiamo dosato il Fgc della soluzione di mix a tempi e temperature diversi. Tali dosaggi sono stati eseguiti su prelievi effettuati in diversi momenti dello studio.

Il metodo utilizzato può essere riassunto in queste cinque fasi:

1. Dosare il fibrinogeno del paziente;
2. Diluire il plasma del paziente 1:1 con il PPN;
3. Dosare il fibrinogeno a tempo zero (T0);
4. Dosare il fibrinogeno dopo un'ora di incubazione (T1);
5. Dosare il fibrinogeno dopo due ore di incubazione (T2).

I dosaggi del fibrinogeno sono stati eseguiti:

- a) dopo aver posto la soluzione mix in bagno termostato a 37 °C;
- b) dopo aver posto la soluzione mix a 4° C (bagno di acqua e ghiaccio).

La prova a 37 °C era finalizzata ad identificare la possibile interferenza delle catene leggere legate al fibrinogeno del paziente con il Fg del PPN. La prova è stata eseguita anche a 4° C per verificare se il legame tra il fibrinogeno e FLC fosse sensibile alla temperatura.

3.2.6. Precipitazione del fibrinogeno

Per ottenere il fibrinogeno purificato dal plasma del paziente in studio abbiamo utilizzato il metodo della precipitazione del fibrinogeno con etanolo in bagno di ghiaccio (*Ismail 2012*). Con questa procedura volevamo valutare la funzionalità del fibrinogeno del paziente e verificare la possibilità che le catene leggere libere legate al Fg nel plasma venissero trascinate con esso nella precipitazione.

La metodica prevedeva che inizialmente si formasse un crioprecipitato, perciò il campione di plasma citratato da precipitare, conservato a -80 °C, è stato scongelato a 4° C overnight, in seguito centrifugato a 4000 RPM per 20' a 4°C. Dopo aver decantato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in 0,9 mL di Buffer (20 mM tris.base, 55 mM sodio citrato, 27 mM lisina, ph 6.8) ed infine la soluzione è stata fatta riposare overnight a temperatura ambiente.

Il giorno seguente abbiamo effettuato la prima precipitazione in etanolo: la soluzione è stata aggiustata con etanolo puro fino alla concentrazione finale di etanolo al 10% e poi incubata overnight in bagno di ghiaccio a 4° C. In seguito la soluzione è stata centrifugata a 4000 RPM per 20 minuti; il sovrnatante è stato decantato ed il pellet risospeso in buffer (0,9 ml). La procedura prevedeva una seconda precipitazione in cui il pellet risospeso in buffer (0,9 ml) veniva di nuovo precipitato alla stessa concentrazione di etanolo. Il campione è stato posto 2 ore in bagno di ghiaccio a 4°C, poi centrifugato a 4000 RPM per 20 minuti. Infine abbiamo eliminato il sovrnatante e risospeso il pellet in 1 ml di buffer.

La soluzione che abbiamo ottenuto conteneva il fibrinogeno purificato dal campione iniziale.

La prima seduta di precipitazione, al fine di mettere a punto il metodo, è stata effettuata su un PPN e su un campione corrispondente ad un controllo con malattia. Al fine di recuperare la maggiore quantità possibile di Fg abbiamo conservato il sovrnatante ottenuto dopo la prima centrifugazione a 4000 RPM per 20 minuti dei campioni, e abbiamo applicato la metodica della precipitazione con etanolo al 10% sia sul crioprecipitato che sul sovrnatante.

3.2.7. Precipitazione del fibrinogeno dal plasma del paziente in studio

Dato lo scarso recupero del fibrinogeno da noi ottenuto tramite la formazione del crioprecipitato, la metodica sopra descritta è stata applicata direttamente sul campione di plasma citratato appena scongelato.

La precipitazione del fibrinogeno è stata eseguita su quattro campioni di plasma del paziente in studio prelevati in date diverse (06/04/2013, 04/06/2013, 08/07/2013, 06/08/2013) e conservati a -80°C.

È stato scongelato un campione di plasma per ogni data ed abbiamo effettuato su di essi la prima precipitazione in etanolo, aggiungendo la quantità necessaria di etanolo per aggiustare il volume di plasma che avevamo a disposizione al 10%:

- primo campione (06/04/2013): 3 ml di plasma + 333 µl di etanolo;
- secondo campione (04/06/2013): 1,5 ml di plasma + 166,5 µl etanolo;
- terzo campione (08/07/2013): 1,5 ml di plasma + 166,5 µl etanolo;
- quarto campione (06/08/2013): 3 ml di plasma + 333 µl etanolo.

In seguito i campioni sono stati posti in bagno di ghiaccio a 4°C over night ed in seguito sono stati centrifugati a 4000 RPM per 20 minuti ed è stato decantato il sovrnatante. I pellet ottenuti sono stati risospesi in buffer (0,9 ml) e aggiustati con etanolo al 10% (0,1 mL) per la seconda precipitazione. I campioni sono stati posti in bagno di ghiaccio per 2 ore, in seguito è stata effettuata la seconda centrifugazione a 4000 RPM per 20 minuti ed infine sono stati decantati i sovrnatanti ed i pellet risospesi in 1 ml di buffer.

3.2.8 Dialisi all'equilibrio

Ottenute le soluzioni di fibrinogeno, è stato necessario sottoporle a dialisi all'equilibrio mediante membrane semipermeabili per purificare le molecole di Fg stesso. Una membrana da dialisi è solitamente costituita da cellulosa semipermeabile, dotata di pori di dimensione approssimativamente costante (possono avere cut off molto diversi) che può lasciar passare solo molecole di piccole dimensioni. Considerando due compartimenti separati da una membrana di questo tipo, dei quali uno contenente una proteina di dimensioni superiori a quelle dei pori, sali e molecole di dimensioni ridotte e l'altro compartimento contenente una soluzione diluita, sappiamo che le molecole a basso peso molecolare potranno diffondere da un compartimento all'altro, fino al raggiungimento una situazione d'equilibrio con uguale concentrazione nelle due camere. Le proteine, invece, saranno ancora tutte nel loro settore originario così che il risultato ci permette di ottenere una diluizione della concentrazione di piccole molecole nel comparto proteico.

In primo luogo abbiamo preparato le soluzioni necessarie: la soluzione esterna che abbiamo costituito solubilizzando 6 g di NaHCO_3 in 300 ml di H_2O con l'aggiunta di 0,6 ml di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0,5 M (diluire EDTA 0,5 M 500 volte) ed il tampone PBS ph 7.4 di cui abbiamo preparato 1.5 l di soluzione, solubilizzando 14.3 g di PBS Dulbecco in 1.5 l di H_2O . Inoltre ci siamo procurati il materiale necessario: membrane (prodotte da MEDICELL INTERNATIONAL LTD, con diametro di 1 cm e $S = 0,785 \text{ cm}^2$), H_2O distillata, agitatore con piastra termica, bilancia elettronica, carta stagnola, vortex, pipette monouso da 10 ml, membrane da dialisi, becker in vetro di vari volumi, magneti per agitazione, guanti senza polvere (per maneggiare le membrane).

Seguendo la metodica abbiamo preparato la soluzione di NaHCO_3 come precedentemente descritto in un becker di vetro e l'abbiamo portata ad ebollizione su di un agitatore con piastra termica. Una volta raggiunto il punto di ebollizione sono state aggiunte le membrane e le abbiamo fatte bollire 10 minuti in agitazione. In seguito, abbiamo trasferito le membrane in H_2O distillata a temperatura ambiente e dopo averle lavate, pipettando all'interno H_2O distillata, le abbiamo fatte bollire in H_2O distillata per 10 minuti.

Dopo sono state tolte e raffreddate in H_2O distillata e a questo punto abbiamo preparato i sacchetti da dialisi, facendo un nodo all'estremità di ciascuna membrana e

lasciando l'altra estremità libera per inserirvi la soluzione di fibrinogeno precipitato, ottenuta precedentemente. L'estremità rimasta aperta è stata chiusa con un nodo ed i sacchetti così formati sono stati trasferiti in un becker contenente 1.5 l di soluzione con tampone fosfato salino (PBS), come descritto dalla figura 18:

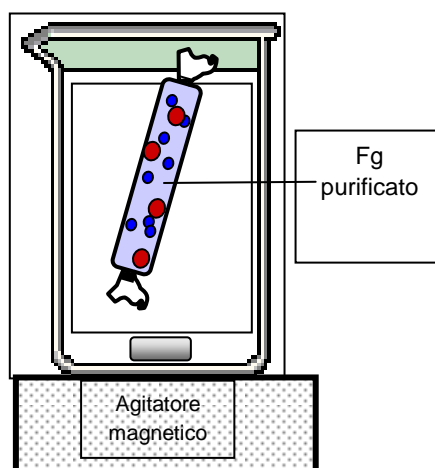


Figura 18

Infine abbiamo fissato i sacchetti sul fondo del beker e abbiamo lasciato dializzare overnight in agitazione a temperatura ambiente.

Il giorno seguente il campione ottenuto dai sacchetti delle membrane è stato centrifugato a 4000 RPM per 20 min a 25°C. Il pellet che abbiamo ottenuto rappresentava il fibrinogeno purificato.

3.2.9 Prove di mixing con fibrinogeno purificato

Sono state eseguite purificazioni del fibrinogeno da campioni di plasma del paziente in studio, da campioni di PPN e da campioni di plasma di quattro controlli con malattia scelti dai 20 casi-controllo in quanto riportavano un TT al sopra del limite massimo di normalità, espressione della disfunzione del fibrinogeno.

Sono state eseguite le seguenti prove di mixing:

➤ Con lo scopo di titolare la quantità di catena leggera libera k legata al Fg del paziente in studio corrispondente al prelievo del 06/04/2013, e per capire a quale diluizione il Fg nella soluzione di mix diventasse dosabile, sono stati fatti dei mixing con la soluzione di Fg

purificato del paziente e Fg purificato dal PPN. Infine è stato dosato il Fgc delle soluzioni di mix.

Sono state effettuate le seguenti diluizioni della soluzione di Fg purificato del paziente con la soluzione di Fg purificato del PPN: 1/10, 1/5, 1/2, 5/1, 10/1, 15/1.

Il valore atteso delle diluizione 1/10, 1/5, 1/2 è stato ricavato secondo questa formula:

$$\text{Fg atteso alla diluizione } X/Y = \frac{\text{Fg purificato PPN} \times (Y-X)}{Y}$$

Il valore atteso delle diluizioni 5/1, 10/1, 15/1 è stato ricavato secondo questa formula:

$$\text{Fg atteso alla diluizione } X/Y = \frac{\text{Fg purificato PPN} \times 1}{X}$$

➤ Sono stati effettuati dei test di mixing anche tra il plasma del paziente e la soluzione di Fg purificato del PPN al fine di valutare l'interazione delle FLC-k libere nel plasma del paziente con il Fg purificato del PPN. In seguito è stato dosato nelle soluzioni di mix il Fgc.

Sono state eseguite le seguenti diluizioni del plasma del paziente con la soluzione di Fg purificato del PPN: 1/5, 1/2, 5/1

➤ Infine sono state effettuate delle prove di mixing sulla soluzione di Fg purificato dei 4 controlli con malattia scelti fra il gruppo dei 20 casi-controllo. Sono state fatte diluizioni scalari tra la soluzione di Fg purificato dei controlli e quella del PPN, così come è stato fatto per il paziente in studio e dosato il Fgc delle soluzioni di mix.

Sono state effettuate le seguenti diluizioni tra la soluzione del Fg purificato dei quattro controlli e quella del PPN: 1/5, 1/2, 5/1, 10/1, 15/1.

I valori attesi del Fgc dei PPN sono stati calcolati secondo le seguenti formule:

$$- 1/10 \rightarrow \frac{(\text{Fg PPN} \times 9) + \text{Fg controllo}}{10}$$

$$- 1/5 \rightarrow \frac{(\text{Fg PPN} \times 4) + \text{Fg controllo}}{5}$$

$$- 1/2 \rightarrow \frac{\text{Fg PPN} + \text{Fg controllo}}{2}$$

$$- 5/1 \rightarrow \frac{(\text{Fg controllo} \times 4) + \text{Fg PPN}}{5}$$

$$- 10/1 \rightarrow \frac{(\text{Fg controllo} \times 9) + \text{Fg PPN}}{10}$$

$$- 15/1 \rightarrow \frac{(\text{Fg controllo} \times 14) + \text{Fg PPN}}{15}$$

3.2.10 Dosaggio delle catene leggere libere (FLC)

La valutazione della concentrazione di un antigene solubile, tramite l'utilizzo di un sistema automatizzato nefelometrico, viene effettuata mediante l'aggiunta del campione da analizzare ad una cuvetta di reazione contenente la soluzione con l'anticorpo specifico. Si verifica una reazione antigene-anticorpo, con formazione di immunocomplessi che disperdono proporzionalmente alla loro quantità, un raggio di luce (LED 840 nm), che viene fatto passare attraverso la cuvetta. In nefelometria la luce dispersa è determinata misurandone l'intensità con una particolare angolazione rispetto alla sorgente luminosa. I valori ottenuti vengono confrontati con una curva di calibrazione costruita precedentemente dallo strumento con degli standard forniti dal kit in uso.

Per la quantificazione delle catene leggere libere Kappa e Lambda nel siero o/e plasma abbiamo utilizzato il kit prodotto dalla The Binding Site® sul sistema automatizzato nefelometrico Siemens BN II® (*Bradwell et al. 2001*). Questo kit ci ha permesso di quantificare solo le catene leggere libere (FLC), grazie alla presenza di un reagente al lattice costituito da antisiero (adeso su particelle di lattice di polistirene) specificamente diretto contro le catene leggere libere poiché ottenuto immunizzando pecore con catene leggere libere umane provenienti da urine di pazienti con proteinuria di BJ. Dall'antisiero sono stati successivamente adsorbiti gli anticorpi diretti contro gli epitopi non specifici per FLC e pertanto tale antisiero lega esclusivamente le FLC e non le catene leggere legate alla catena pesante delle immunoglobuline.

3.2.11. Immunofissazione delle proteine

Per il rilevamento delle proteine monoclonali nel siero del paziente, mediante immunofissazione, abbiamo utilizzato il kit Hydragel® in combinazione con il sistema semi-automatico HYDRAS SEBIA®. Il sistema prevede che le proteine siano separate mediante elettroforesi su gel di agarosio tamponato in mezzo alcalino ed che in seguito siano incubate con singoli antisieri specifici anti-catene pesanti γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM) ed anti-catene leggere (libere e legate) kappa e lambda. Dopo la rimozione delle proteine che non hanno reagito, gli immunoprecipitati vengono colorati con violetto acido. I gel sono interpretati visivamente per valutare la presenza di reazioni specifiche con le sospette proteine monoclonali, e quindi permettono il riconoscimento di bande anomale nei quadri elettroforetici di siero e proteine, in particolare nella zona delle β -globuline e delle γ -globuline, che possono essere presunte proteine monoclonali (M-proteine, paraproteine o immunoglobuline monoclonali), indice di gammopatie monoclonali. Nella figura 19 è riportato un esempio di immunofissazione eseguita con il kit descritto.

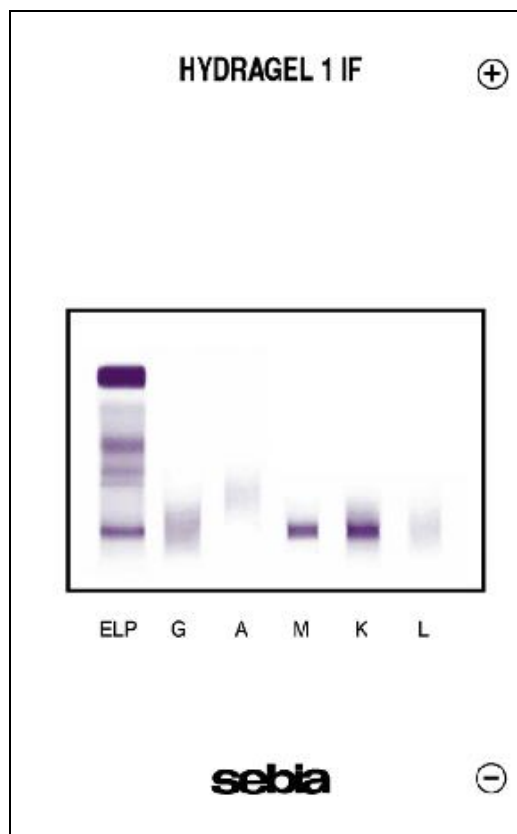


Figura 19. Esempio di immunofissazione dove si evidenzia una componente monoclonale IgM-k

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Dosaggi del fibrinogeno coagulativo secondo Clauss (Fgc), tempo di trombina (TT) e catene leggere libere k e λ (FLC-k e FLC- λ)

Gli esami emocoagulativi eseguiti dal paziente in studio in data 06/04/2013, presso il laboratorio di Patologia Clinica Universitario dell'A.U.O. Pisana, mostravano TT e Fgc incoagulabili. Dopo terapia con desametasone (effettuata nel mese di Maggio: 2 quadripette separate da 15 giorni di pausa) gli esami eseguiti in data 04/06/2013 evidenziavano miglioramento del quadro coagulativo con aumento del Fgc che rientrava nella norma (V.N.=295mg/dl), nonostante persistesse allungamento del TT, mai rientrato nel range di normalità (V.N.= <16.6 sec). Nei mesi successivi il Fgc tornava a ridursi (tabella 4). I dosaggi delle catene leggere libere, eseguiti in data 06/04/2013, mostravano un valore di FLC-k ben al di sopra del range di normalità mentre, dopo terapia (04/06/2013), si è osservato ulteriore incremento delle FLC-k: ciò ci ha portato a supporre l'interazione tra le FLC-k e la molecola del fibrinogeno. Il confronto tra la quantità di FLC-k dosate sui campioni di plasma e di siero del paziente provenienti dallo stesso prelievo di sangue ha messo in evidenza la maggior concentrazione di queste nel campione di plasma suggerendo che la catena leggera poteva essere in gran parte legata alla molecola di fibrinogeno presente nel campione di plasma e non di siero. Viceversa la quantità di FLC- λ dosate su plasma e su siero risultava pressoché sovrapponibile (tabella 5).

Parallelamente abbiamo valutato i valori di TT, Fgc, FLC-k e FLC- λ dei controlli patologici (con M.M. conclamato ma vario), che sono riportati in tabella 6. Quattro di tali controlli mostravano un allungamento del TT a fronte di valori normali di Fg coagulativo. Questi pazienti saranno ulteriormente indagati con immunofissazione su siero e su plasma e prove di mixing.

I controlli sani invece, presentavano tutti valori di TT e Fg coagulativo nel range di normalità (tabella 7).

DATA	PT (sec)	aPTT (sec)	Fgc (mg/dl)	TT (sec)
06/04/2013	Incoagulabile	Incoagulabile	Incoagulabile	Incoagulabile
04/06/2013	10,1	32,0	295	20
19/06/2013	11,1	32,5	174	18.8
08/07/2013	11,1	30,4	133	21.2
07/08/2013	11,3	33,1	142	21,2
10/09/2013	10,9	27,2	88	incoagulabile

Tabella 4. Andamento degli esami emocoagulativi del paziente in studio
(valori normali PT= 10,6-12.5 secondi, aPTT = 30-36,5 secondi, Fgc=150-400 mg/dl, TT=10,3-16,6 sec)

DATA ESAME	FLC-k (mg/dl)	FLC-k (mg/dl)	FLC-λ (mg/dl)	FLC-λ (mg/dl)
	PLASMA	SIERO	PLASMA	SIERO
05/04/2013	29,800	-	0,579	-
04/06/2013	349,000	-	0,629	-
08/07/2013	203,000	24,300	0,532	0,604
30/08/2013	250,000	26,900	0,602	0,694

Tabella 5. Dosaggi di FLC-k e λ su plasma e siero del paziente in studio
(valori normali FLC-κ= 0,330-1,94 mg/dl, FLC-λ= 0,571-2,630 mg/dl).

PAZIENTE	DIAGNOSI	TT	Fgc mg/dl	FLC-κ mg/dl	FLC-λ mg/dl
		sec		plasma	plasma
Caso-controllo 1	MM	14,8	386	316,0	2,630
Caso-controllo 2	MM	13,6	349	1,360	0,559
Caso-controllo 3	MM	30,3	272	0.927	61,00
Caso-controllo 4	MM	16,2	231	0.177	0,567
Caso-controllo 5	MM	14,9	335	6,02	0,20
Caso-controllo 6	MM	14,6	202	31,3	0,832
Caso-controllo 7	MM	17,1	252	0,01	710
Caso-controllo 8	MM	17,9	369	0,166	3,56
Caso-controllo 9	MM	14,6	292	25,5	0,038
Caso-controllo 10	MM	16,3	397	0,955	10,6
Caso-controllo 11	MM	16,6	244	55,6	0,013
Caso-controllo 12	MM	13,9	359	2,01	0,615
Caso-controllo 13	MM	14,7	771	-	-
Caso-controllo 14	MM	15,9	292	1,48	421,0
Caso-controllo 15	MM	13,6	327	15,3	0,55
Caso-controllo 16	MM	16,0	403	2,81	0,005
Caso-controllo 17	MM	16,0	285	5,4	0,088
Caso-controllo 18	MM	15,2	443	76,3	1,03
Caso-controllo 19	MM	12,5	603	-	-
Caso-controllo 20	MM	16,2	310	2,19	4,59

Tabella 6. Dosaggi TT , Fgc, FLC-k e FLC-λ nei casi-controllo
(valori normali TT=10,3-16,6 sec, Fgc=150-400 mg/dl, FLC-κ= 0,330-1,94mg/dl,
FLC-λ= 0,571-2,630 mg/dl).

CONTROLLO SANO	TT (sec)	Fgc (mg/dl)
Controllo 1	15,3	218
Controllo 2	14,5	252
Controllo 3	14,1	344
Controllo 4	16,4	171

Tabella 7. Dosaggi TT e Fgc dei controlli sani
(valori normali TT=10,3-16,6 sec, Fgc=150-400 mg/dl)

4.2 Risultati dei dosaggi del Fgc nella soluzione di mix tra la plasma del paziente e pool di plasmi normali (PPN) a tempi diversi e temperature diverse

I risultati del fibrinogeno coagulativo nella soluzione di mix mantenuta in bagno termostato a 37°C tra il plasma del paziente in studio, prelevato in diversi momenti dello studio, ed il PPN sono rappresentati nella tabella 8.

Data prelievo	Dosaggio Fgc nel paziente	Valore Fgc atteso nella mix	Fgc mix 1:1 PPN/plasma T0	Fgc mix 1:1 PPN/plasma T1	Fgc mix 1:1 PPN/plasma T2
06/04/2013	inc	159	inc	inc	inc
04/06/2013	295	306	318	310	299
08/07/2013	133	225	252	227	229

Tabella 8. Risultati ottenuti nelle soluzioni di mix tra il plasma del paziente, relativo a varie date, e PPN a 37° C.

(Fgc PPN =318 mg/ml; inc = incoagulabile, T0= dosaggio Fgc immediato, T1= dosaggio Fgc dopo 1 h di incubazione, T2= dosaggio Fgc dopo 2 h di incubazione)

Dai risultati ottenuti e riportati nella tabella 8 possiamo osservare che:

- il plasma del paziente in data 06/04/2013, presentava un fibrinogeno incoagulabile e che la miscela a T0 e dopo incubazione a 37°C a T1 e T2 non induceva alcun incremento dei valori di Fgc.
- in data 04/06/2013, dopo aver effettuato terapia con desametasone, il paziente mostrava un livello di Fgc rientrato nel range di normalità. Al T0 la miscela 1:1 mostra un valore di Fgc vicino al teorico atteso. Ugualmente non si riscontrano differenze a T1 e T2.
- in data 08/07/2013, dopo circa 45 giorni dal termine della terapia, il paziente presentava nuovamente riduzione dei valori di Fgc. I risultati di Fgc delle mix a T0, T1 e T2 non mostrano discordanze significative rispetto al valore atteso.

Nella tabella 9 sono riportati i risultati del Fgc nelle mixing a 4° C:

Data prelievo	Dosaggio Fgc nel paziente	Valore Fgc atteso nella mix	Fgc mix 1:1	Fgc mix 1:1	Fgc mix 1:1
			PPN/plasma T0	PPN/plasma T1	PPN/plasma T2
06/04/2013	inc	159	inc	inc	inc
04/06/2013	295	306	303	295	292
08/07/2013	133	225	231	231	241

Tabella 9. Risultati ottenuti nelle soluzioni di mix tra il plasma del paziente, relativo a varie date, e PPN a 4° C

(Fgc PPN =318 mg/ml; inc = incoagulabile, T0= dosaggio Fgc immediato, T1= dosaggio Fgc dopo 1 h di incubazione, T2= dosaggio Fgc dopo 2 h di incubazione)

Dai valori ottenuti abbiamo osservato che il Fgc del paziente, in data 06/04/2013, rimane indosabile. I valori dei campioni del 04/06/2013 e dell' 08/07/2013 non si discostano da quelli ottenuti a 37° C, pertanto possiamo concludere che la diversa temperatura non influisce sul legame tra il fibrinogeno e la catena leggera libera.

4.3 Messa a punto del metodo di precipitazione del fibrinogeno

Dopo aver effettuato la precipitazione del fibrinogeno sia sul sovranatante che sul crioprecipitato, abbiamo ottenuto quattro soluzioni finali: due soluzioni di Fg purificato seguendo la metodica per la formazione del crioprecipitato (una del PPN e una del campione con malattia) e due soluzioni di Fg purificato dal sovranatante conservato.

In seguito abbiamo purificato le soluzioni con dialisi all'equilibrio. Per valutare la quantità di fibrinogeno ottenuta dalla precipitazione, abbiamo dosato il Fgc sulle quattro soluzioni. Nella tabella 10 sono riportati i valori ottenuti.

CAMPIONE	MATERIALE	Fgc recuperato dopo precipitazione (mg/dl)
PPN	crioprecipitato	36
PPN	sovrinatante	292
Controllo con malattia (MM)	crioprecipitato	45
Controllo con malattia (MM)	sovrinatante	416

Tabella 10. Dosaggio del Fgc sulle soluzioni ottenute dopo precipitazione e purificazione da PPN e da un campione con malattia.

Dato lo scarso recupero del fibrinogeno nel crioprecipitato e un buon recupero di Fg nel sovrinatante abbiamo deciso di modificare la metodica applicando direttamente la prima precipitazione in etanolo direttamente sul campione di plasma, saltando la formazione del crioprecipitato.

4.4 Dosaggio del fibrinogeno purificato dai campioni di plasma del paziente in studio, in date diverse

Per valutare se la catena leggera libera precipitava insieme al fibrinogeno abbiamo precipitato il fibrinogeno da campioni di plasma del paziente prelevati in date diverse ed in seguito abbiamo dosato il Fgc nelle soluzioni di Fg purificato ottenuto (tabella 11).

CAMPIONE	Fgc recuperato dopo precipitazione (mg/dl)
Plasma prelevato in data 06/04/2013	indosabile
Plasma prelevato in data 04/06/2013	123
Plasma prelevato in data 08/07/2013	142
Plasma prelevato in data 07/08/2013	149

Tabella 11. Dosaggio del Fgc sulle soluzioni dopo precipitazione e purificazione, da campioni di plasma dal paziente in studio

Il risultato ottenuto dalla soluzione di fibrinogeno purificato da plasma del paziente, prelevato in data 06/04/2013, mostra un Fgc ancora incoagulabile, a dimostrazione del fatto che la FLC-k rimane legata al fibrinogeno, durante la precipitazione rendendolo non funzionale. Dalle altre soluzioni di Fg purificato abbiamo ottenuto un buon recupero di Fg.

4.5 Prove di mixing con Fg purificato dal pool di plasmi normali (PPN) e Fg purificato dal plasma del paziente in studio

I risultati delle prove di mixing con fibrinogeno purificato del PPN e Fg purificato del paziente sono riportate nella tabella 12. Rispetto al Fgc atteso si osserva una progressiva riduzione del Fgc della mix, con massima caduta alla diluizione 1/2. A partire dalla diluizione 5/1 i valori del Fgc rimangono pressoché costanti. Si potrebbe ipotizzare interferenza della catene leggere legate al fibrinogeno del paziente che però sembrerebbero raggiungere un punto di “saturazione” senza ulteriori cadute nonostante il progressivo incremento della concentrazione del Fg del paziente. Una volta che le catene leggere libere, legate al Fg purificato del paziente, hanno interagito con una determinata quantità del Fg purificato dal PPN, precisamente alla diluizione 5/1, le catene sembrano esaurire tutti i possibili siti di legame ed un’ulteriore incremento della quantità di Fg purificato del paziente non determina grandi variazioni intorno al valore di Fg dosato.

DILUIZIONE	VOLUME (μl) della soluzione di Fg purificato del paziente	VOLUME (μl) della soluzione di Fg purificato del PPN	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella soluzione di mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella soluzione di mix
1/10	30	270	263	239
1/5	40	160	234	216
1/2	100	100	146	173
5/1	160	40	58	125
10/1	270	30	29	121
15/1	186,7	13,3	19	125

Tabella 12. Risultati dei dosaggi di fibrinogeno coagulativo (Fgc) nelle soluzioni di mix, a diverse diluizioni, tra Fg purificato del paziente (Fgc=incoagulabile) e Fg purificato del PPN (Fgc= 292 mg/dl) rispetto ad un valore teorico atteso.

4.6 Prove di mixing con plasma del paziente e Fg purificato del PPN

I risultati del test di mixing effettuato utilizzando diluizioni scalari del plasma del paziente e fibrinogeno purificato dal PPN, sono descritti nella tabella 13.

DILUIZIONE	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato PPN	VOLUME (μl) plasma paziente	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella mix
1/5	40	160	58,4	inc
1/2	100	100	146,0	43
5/1	160	40	233,6	214

Tabella 13. Risultati dei dosaggi di fibrinogeno coagulativo (Fgc) nelle mix, a diverse diluizioni, tra la soluzione di fibrinogeno purificato del PPN (Fgc=292 mg/dl) e il plasma del paziente (Fgc=incoagulabile) rispetto ad un valore teorico atteso.

Nella miscela 1/2 possiamo riscontrare una ripresa della funzionalità coagulativa del Fg del paziente, assente nella diluizione 1/5, dove le catene leggere libere rendono non funzionale anche il Fg del PPN. Inoltre vediamo che nella diluizione 5/1, viene ridotta la funzionalità del Fg del PPN in quanto il valore ottenuto è inferiore a quello atteso (214 vs 233,6 mg/dl).

4.6.1. Prove di mixing tra Fg purificato del PPN e Fg purificato dei quattro campioni di controllo con malattia

Nelle tabelle sottostanti 14/15/16/17 sono riportati i risultati del Fgc ottenuti nelle diverse soluzioni di mixing effettuate tra la soluzione di Fg purificato nei quattro pazienti con MM (e TT allungato) e la soluzione di Fg purificato del PPN. È riportato il valore atteso teorico di Fgc per ciascuna mix:

DILUIZIONE	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato caso-cnt 3	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato PPN	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella mix
1/10	30	270	109,2	98
1/5	40	160	110,4	107
1/2	100	100	114,0	117
5/1	160	40	117,6	117
10/1	270	30	118,8	111
15/1	186,7	13,3	119,2	111

Tabella 14. Mixing test tra Fg purificato del controllo con malattia N 3 (Fgc=120 mg/dl) e Fg purificato del PPN (Fgc=108 mg/dl).

DILUIZIONE	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato caso-cnt 7	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato PPN	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella mix
1/10	30	270	97,5	104
1/5	40	160	98,0	104
1/2	100	100	99,5	99
5/1	160	40	101,0	100
10/1	270	30	101,5	87
15/1	186,7	13,3	101,6	95

Tabella 15. Mixing test tra Fg purificato del controllo con malattia N 7 (Fgc=102 mg/dl) e Fg purificato del PPN (Fgc=97 mg/dl).

DILUIZIONE	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato caso-cnt 8	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato PPN	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella mix
1/10	30	270	99	102
1/5	40	160	101	13
1/2	100	100	107	110
5/1	160	40	113	111
10/1	270	30	115	108
15/1	186,7	13,3	115,6	134

Tabella 16. Mixing test tra Fg purificato del controllo con malattia N 8 (Fgc=117 mg/dl) e Fg purificato del PPN (Fgc=97 mg/dl)

DILUIZIONE	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato caso-cnt 11	VOLUME (μl) soluzione Fg purificato PPN	Fgc (mg/dl) <u>atteso</u> nella mix	Fgc (mg/dl) <u>ottenuto</u> nella mix
1/10	30	270	103,7	91
1/5	40	160	100,4	117
1/2	100	100	90,5	98
5/1	160	40	80,6	84
10/1	270	30	77,3	80
15/1	186,7	13,3	76,2	78

Tabella 17. Mixing test tra Fg purificato del controllo con malattia N 11 (Fgc=74 mg/dl) e Fg purificato del PPN (Fgc=97 mg/dl)

Dai risultati delle tabelle sovrastanti abbiamo potuto osservare che non c'era una significativa differenza tra i valori attesi di Fgc nelle mixing e quello effettivamente dosato. Il fibrinogeno purificato dai controlli con malattia, scelti perché caratterizzati da un TT al di fuori del range massimo di normalità, non risentiva dell'influenza delle catene leggere libere, a differenza di quanto accade per il Fg del paziente in studio.

4.7 Immunofissazione

4.7.1 Immunofissazione del caso clinico in studio

Le indagini di Immunofissazione sono state eseguite su campioni di plasma e siero del paziente in momenti diversi dello studio come di seguito riportato:

1. L'immunofissazione sul campione di siero prelevato in data 05/04/2013 non evidenzia la presenza di componenti monoclonali mentre nel campione di plasma compare una debole banda tra le catene leggere di tipo K all'altezza della banda del fibrinogeno (figure 20 e 21).

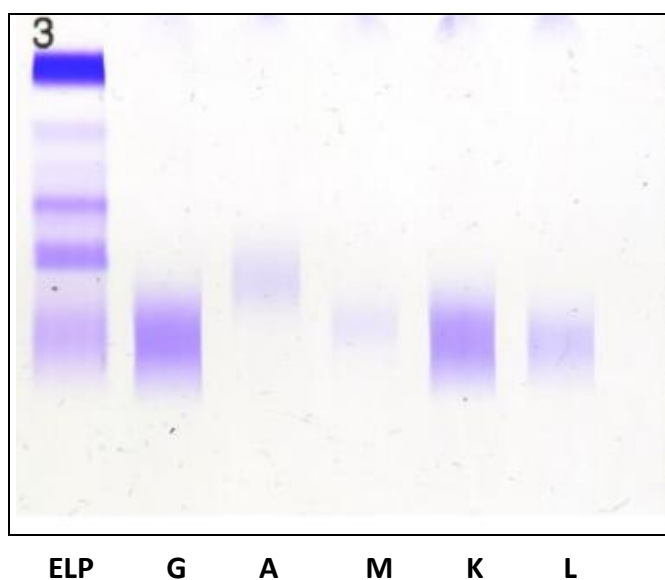


Fig. 20
IF sul campione di **siero** del
05/04/2013:
Assenza di componenti
monoclonali

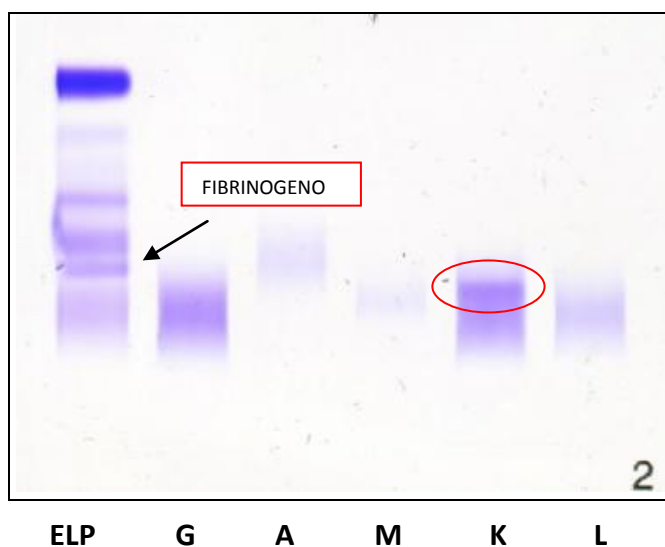
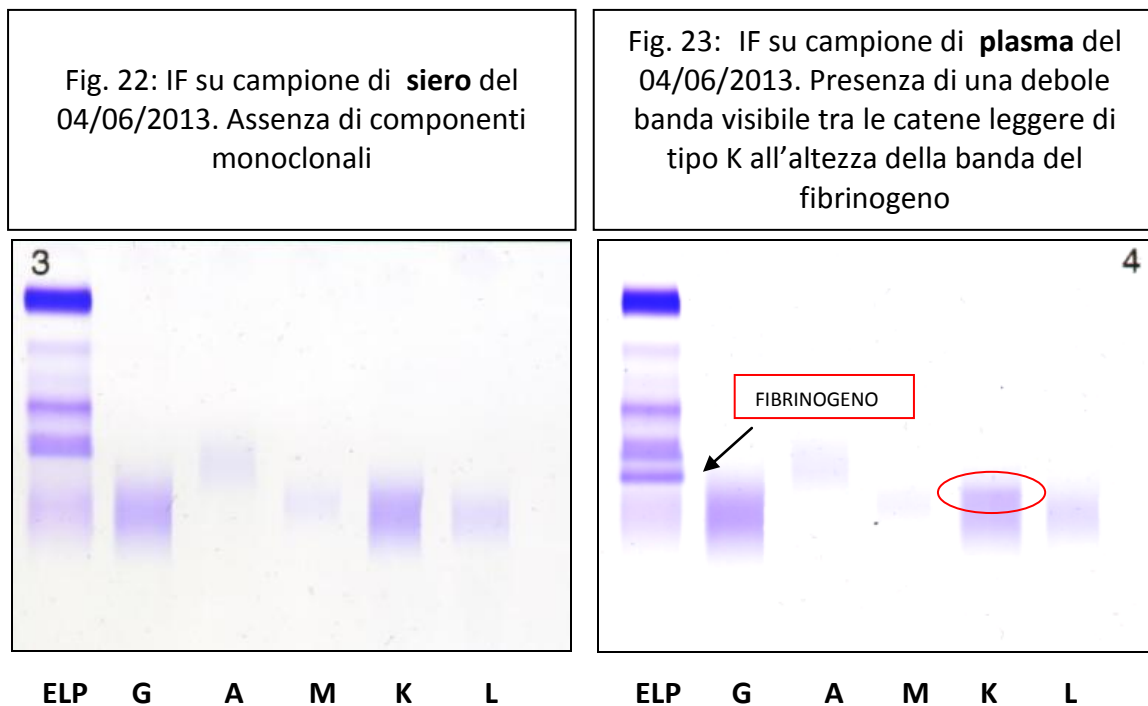


Fig. 21
IF sul campione di **plasma** del
05/04/2013: presenza di una
debole banda visibile tra le
catene leggere di tipo K
all'altezza della banda del
fibrinogeno

2. Le immunofissazioni sui campione di siero e plasma, prelevati in data 04/06/2013, mostrano gli stessi risultati ottenuti nei campioni prelevati nel mese di aprile ovvero assenza di componenti monoclonali nel campione di siero e presenza di una debole banda visibile tra le catene leggere di tipo K all'altezza della banda del fibrinogeno nel campione di plasma (figure 22 e 23). È da notare la minore intensità della banda nella figura 23 (in corrispondenza delle catene K e all'altezza del fibrinogeno) rispetto a quella osservata nella figura 21. Questo potrebbe essere giustificato dal fatto che in seguito all'inizio della terapia con cortisonici nel mese di maggio le catene leggere libere legate al fibrinogeno si sono notevolmente ridotte (abbiamo infatti trovato livelli plasmatici di FLC-k molto più elevati rispetto al periodo precedente l'inizio della terapia).



3. Infine, stesse evidenze si è riscontrata per i campioni di siero e plasma prelevati in data 08/07/2013 (figura 24 e 25).

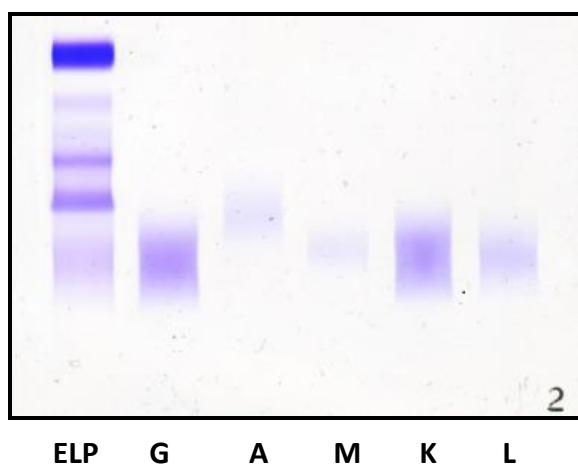


Figura 24
IF su campione di **siero** dell'
08/07/2013:
Assenza di componenti
monoclonali

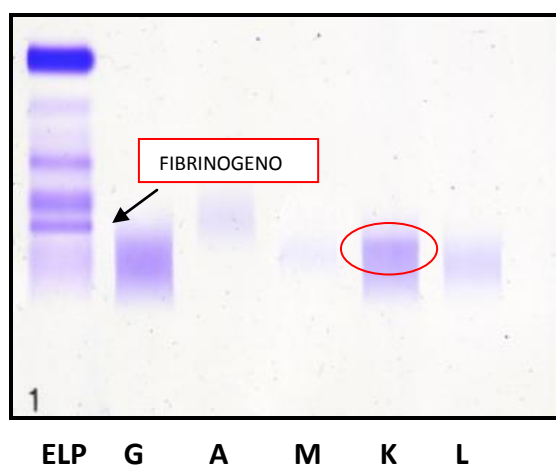


Figura 25: IF su campione di
plasma dell' 08/07/2013: presenza
di una debole banda visibile tra le
catene leggere di tipo K all'altezza
della banda del fibrinogeno

4.7.2. Immunofissazione su siero e plasma dei controlli con malattia

Abbiamo effettuato l'IF su siero e plasma, prelevati in data 30/08/2013, dei quattro controlli con mieloma multiplo con accertata presenza di FLC κ/λ e TT allungato (figure 26-33).

I risultati dell'IF su plasma e siero dei quattro controlli con MM., mostrano positività per la presenza di bande monoclonali di FLC, ma nessuna presenza di banda all'altezza del fibrinogeno.

Figura 26: IF su **siero** del 3° controllo (TT= 30,3 sec). Si osserva componente monoclonale IgG- λ

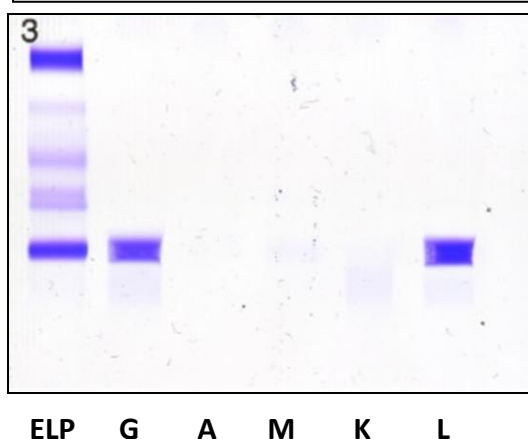


Figura 27: IF su **plasma** del 3° controllo (TT = 30,3 sec). Si osserva componente monoclonale IgG- λ

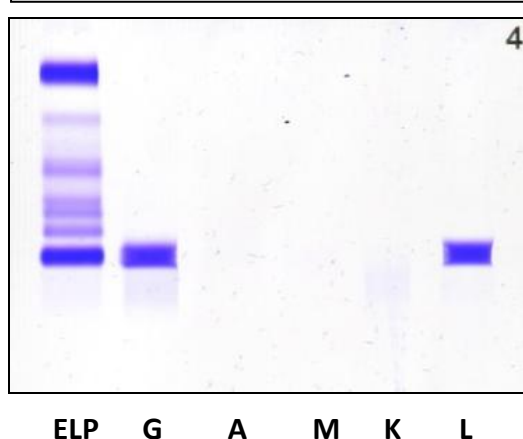


Figura 28: IF su **siero** del 7° controllo (TT=17,1 sec). Si osserva componente monoclonale λ (mieloma micromolecolare)

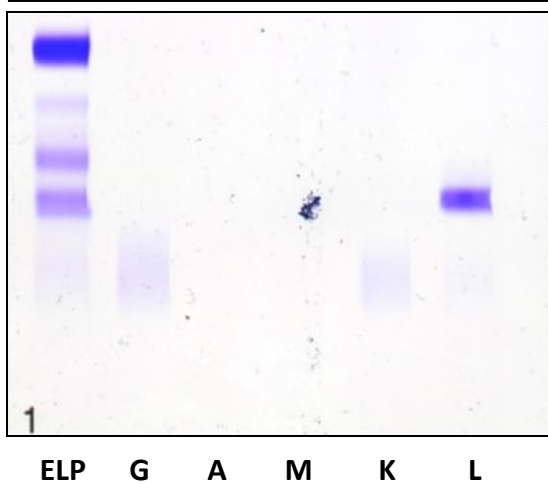


Figura 29: IF su **plasma** del 7° controllo (TT=17,1 sec). Si osserva componente monoclonale λ (mieloma micromolecolare)

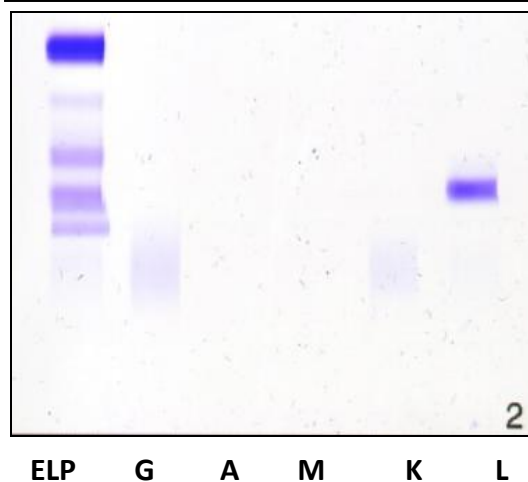


Figura 30: IF su **siero** del 8° controllo (TT=17,9 sec). Si osserva componente monoclonale IgG-λ

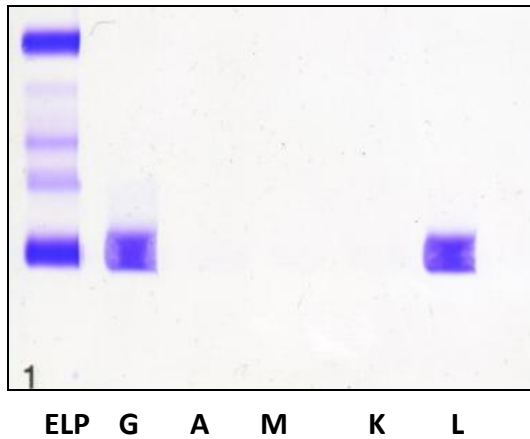


Figura 31: IF su **plasma** del 8° controllo (TT=17,9 sec). Si osserva componente monoclonale IgG-λ

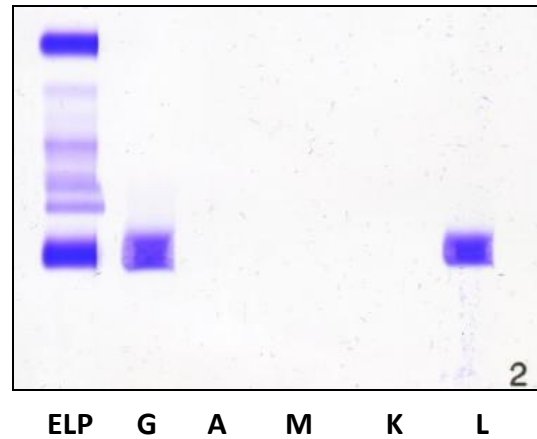


Figura 32: IF su **siero** del 11° controllo (TT=16,6 sec). Si osserva componente monoclonale IgG-k

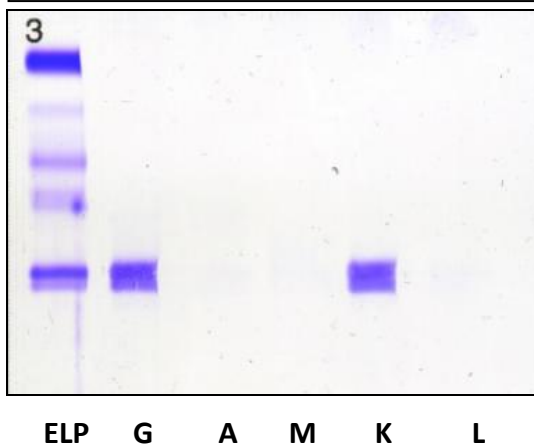
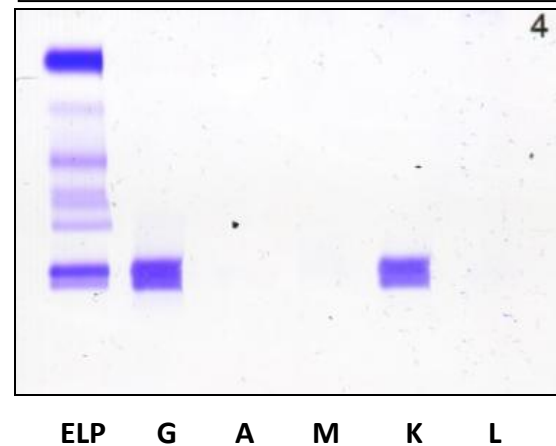


Figura 33: IF su **plasma** del 11° controllo (TT=16,6 sec). Si osserva componente monoclonale IgG-k



5. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti possiamo trarre alcune conclusioni:

L'indagine con immunofissazione su plasma del paziente in studio mostra la presenza di una debole banda visibile tra le catene leggere di tipo k. Il fatto che tale banda migrasse alla stessa altezza della banda del fibrinogeno ci ha fatto ipotizzare una possibile interferenza delle catene leggere con il Fg; dopo gli studi effettuati possiamo concludere che il mancato riscontro della banda all'IF su siero può essere dovuto al fatto che le FLC-k rimangono legate al fibrinogeno, assente nel campione di siero. I risultati dei dosaggi delle FLC sostengono questa ipotesi.

La concentrazione delle FLC-k su plasma del paziente risulta maggiore rispetto a quella rilevata su siero. Anche questi risultati possono essere spiegati dall'ipotesi che le FLC-k, nel campione di siero, rimangano intrappolate nel coagulo insieme al fibrinogeno trasformato in fibrina. A conferma abbiamo i diversi risultati ottenuti, nelle stesse condizioni, per la FLC- λ , che mostrano la stessa concentrazione su siero e su plasma.

All'inizio dello studio il paziente presentava anomalie del profilo emocoagulativo (PT, aPTT, TT, Fgc non valutabili) che andavano migliorando a seguito di terapia steroidea (iniziata nel mese di Maggio). Tale miglioramento potrebbe essere legato al distacco di una parte delle FLC-k dalla molecola del fibrinogeno, rendendolo nuovamente funzionale. A favore di questa ipotesi abbiamo il dato che il dosaggio di FLC-k su campione di plasma prelevato in quella data mostra un livello aumentato rispetto a quello antecedente all'inizio della terapia.

Per indagare la possibile sede e modalità di interferenza della FLC-k con la molecola del fibrinogeno sono stati eseguiti test di mixing servendosi di un pool di plasmi normale (PPN).

I risultati dei mix test effettuati a temperature diverse (37°C/4°C), mostrano che:

- nelle prove a 37°C le catene leggere libere presenti nel plasma del paziente in studio si andavano a legare anche alla molecola del fibrinogeno del PPN (oltre che a quello del paziente) rendendolo non funzionale.

-nelle prove a 4°C non si riscontravano differenze rispetto alla prova a 37°C escludendo differenze di comportamento nella capacità di legame della catena leggera libera al bersaglio antigenico a diverse temperature.

Le prove di mixing tra plasma del paziente (Fgc = inc.) e Fg purificato dal PPN (Fgc=296 mg/dl) confermano la capacità delle FLC-k del paziente di interferire con il fibrinogeno di soggetti sani: l'aumento della quantità di Fg purificato del PPN nella miscela portava un progressivo incremento del Fgc misurabile, che tuttavia rimaneva inferiore ai valori attesi.

Le prove con Fg purificato del paziente e quello del PPN, mostrano che le catene leggere legate alla molecola di Fg del paziente inibiscono la funzionalità del Fg del PPN.

I risultati sul gruppo di controllo dei pazienti con mieloma preso in considerazione, mostrano:

- assenza di una banda monoclonale all'altezza di quella del fibrinogeno
- esclusione di qualsiasi tipo di interferenza fra catene leggere libere, eventualmente legate alle molecole del Fg dei pazienti, e la molecola del Fg del PPN, evidenziata tramite prove di mixing tra Fg purificato dei pazienti e Fg purificato del PPN.

Un'ipotesi da verificare sarà quella di individuare se la FLC-k possa interferire sulla prima tappa della fibrino-formazione, ossia sul rilascio del fibrinopeptide A e/o B dal momento che può essere escluso l'interessamento della fase di stabilizzazione del coagulo in quanto il paziente non mostrava diatesi emorragica. Inoltre, poiché le prove di aggregazione piastrinica risultavano nella norma può essere escluso l'interessamento della porzione del fibrinogeno implicata nel legame con la glicoproteina di superficie piastrinica GPIIb/IIIa.

Il sospetto è che possa essere interessato il fibrinopeptide B, rilasciato secondariamente e più lentamente rispetto al fibrinopeptide A, perché in letteratura i casi nei quali è compromesso il rilascio dell' FpA si accompagnano a manifestazioni di tipo emorragico, che il nostro paziente non ha mai riferito.

6. BIBLIOGRAFIA

Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckwaert J-J. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GP IIb-IIIa. *J Biol Chem* 1989; 264: 9258–65.

Asch, E., and Podack, Vitronectin binds to activated human platelet and plays a role in platelet aggregation. *E. J. Clin. Invest.* 1990; 85,1372-1378.

Ashby MA, Lazarchick J. Case report: acquired dysfibrinogenemia secondary to mithramycin toxicity. *Am J Med Sci.* 1986; 292:53–55.

Asselta R, Duga S, Modugno M, et al. Identification of a glucocorticoid response element in the human γ chain fibrinogen promoter. *Thromb Haemost* 1998; 79:1144.

Axiak SM, Krishnamoorthy L, Guinan J, Raison RL. Quantitation of free kappa light chains in serum and urine using a monoclonal antibody based inhibition enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Methods* 1987; 99: 141–7.

Bale MD, Westrick LG, Mosher DF. Incorporation of thrombospondin into fibrin clots. *J Biol*
Baumhueter S, Courtois G, Crabtree GR. A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the β fibrinogen gene promoter as HNF-1. *EMBO J* 1988; 7:2485.

Beguin S, Kumar R. Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link. *Thromb Haemost* 1997; 78:590.

Belkin AM, Tsurupa G, Zemskov E, Veklich Y, Weisel JW, Medved L. Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) α C-domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood* 2005.

Bennett, J.S., Vilaire, G., and Cines, D.B. *J Biol Chem* 1982; 257:8049-8054.

Bizzozzero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore* 1881; 17: 3.

Blomback B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L. A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 1978; 275: 501–5.

Blomback B, Blomback M, Henschen A, et al. N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Nature* 1968; 218:130.

Blomback B., Hessel B., Hogg D. Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human fibrinogen. *Thromb. Res.* 1976; 8:639-658.

Booth N, Bachman F. Plasminogen-plasmin system, in Coleman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (eds). Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Philadelphia, PA, Lippincott Williams Wilkins, 2006; 335–365.

Bouma H, Takagi T, Doolittle RF. The arrangement of disulfide bonds in fragment D from human fibrinogen. *Thromb Res* 1978; 13:557.

Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47:673-80

Brass LF, Wannemacher KM, Ma P, Stalker TJ. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 2011; 1: 66–75.

Brian Savage and Zaverio M. Ruggeri. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem* 1991; 266:11227-11233.

Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988; 71:335–343.

Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood* 2011, 118: 6963–6970.

Chung DW, Davie EW. γ and γ' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry* 1984; 23:4232.

Colman RW, George JN, Hirsh J, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 3–16.

Conti P, Bartle L, Barbacane RC, et al. The down regulation of IL-6 stimulated fibrinogen steady state mRNA and protein levels by human recombinant IL-1 is not PGE2 dependent: effects of IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). *Mol Cell Biochem* 1995; 142:171.

Crabtree GR. The molecular biology of fibrinogen. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P et al., eds. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1987:631-661.

Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005; 579: 3310–3316.

Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor-1-dependent IL-6-responsive element. *Mol Cell Biol* 1993; 13:1183.

Dang CV, Skin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW J Fibrinogen sialic acid residue are low affinity calcium-binding site that influence fibrin assembly. *Biol Chem* 1989; 264:5104.

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310–1312.

Dawson NA, Barr CF, Alving BM. Acquired dysfibrinogenemia: paraneoplastic syndrome in renal carcinoma. *Am J Med.* 1985; 78:682–686.

Dispensieri A., Kyle R., Merlini G., Miguel JS., Ludwig H., Hajek R., Palumbo A., Jagannath S., Blae J., Lonial S., Dimopoulos M., Comenzo R., Heisele H., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Harousseau JL., Attal M., Tosi P., Sonneveld P., Boccadoro M., Morgan G., Richardson P., Sezer O., Mateos MV., Cavo M., Joshua D., Turesson I., Chen W., Shimizu K., Powles R., Rajkumar SV., Durie BGM. International myeloma working group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23:215-224.

Dear A. , S.O. Brennan, M.J. Faed, P.M. George. Acquired dysfibrinogenemia caused by monoclonal production of immunoglobulin λ light chain. *Haematologica* 2007; 92:e111-e117.

Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116: 754–761.

Doolittle RF. The amino acid sequence of the alfa-chain of human fibrinogen. *Nature* 1979; 280:464.

Doolittle RF. *Thromb Haemost* (Bloom AL; Thomas DP, eds) Churchill Living-stone, Edinburgh 1981; 163-197.

Doolittle RF. Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood Rev* 2003; 17:33.

Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900 – 2, *Chem* 2001; 47: 673 – 80.

Dunn E, Ariëns RAS, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on clot structure and function. *Diabetologia* 2005; 48: 1198-1206.

Ebert R. *Index of Variant Human Fibrinogens*. Boca Raton, Fla: CRC 1994; Press.

Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743–4746.

Fornace AJ Jr, Cummings DE, Comeau CM, et al. Structure of the human gamma-fibrinogen gene. Alternate mRNA splicing near the 3' end of the gene produces gamma A and gamma B forms of gamma fibrinogen. J Biol Chem 1984; 259:12826.

Francis CW, Marder VJ, Martin SE. Demonstration of a large molecular weight variant of the gamma chain of normal human plasma fibrinogen. J Biol Chem 1980; 255:5599.

Francis CW, Muller E, Henschen A, et al. Carboxyl-terminal amino acid sequences of two variant forms of the gamma chain of human plasma fibrinogen. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:3358.

Fu Y, Grieninger G. Fib₄₂₀: a normal human variant of fibrinogen with two extended α chains. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:2625.

Galanakis DK, Ginzler EM, Fikrig SM. Monoclonal IgG anticoagulants delaying fibrin aggregation in two patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Blood 1978; 52:1037-46.

Galanakis DK. Inherited dysfibrinogenemia: emerging abnormal structure associations with pathologic and nonpathologic dysfunctions. Semin Thromb Hemost 1993; 19:386–395.

Garlund B, Hessel B, Marguerie G, et al. Primary structure of human fibrinogen: characterization of disulfide-containing cyanogen-bromide fragments. Eur J Biochem 1977; 77:595.

Gartner, K.T. & M.L. Ogilvie. Peptides and monoclonal antibodies which bind to platelet glycoproteins IIb and/or IIIa inhibit clot retraction. Thromb Res 1988; 49:43–53.

Ghosh S, Mcevoy P, Mcverry BA. Idiopathic autoantibody that inhibits fibrin monomer polymerization. Br J Haematol 1983; 53:65-72.

Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. J Cell Sci 2004; 117: 3415–3425.

Ginell R, Post, Lindsey James, Daisy Alapat, Virginia Guillory, Michele Cottler-Fox, Mayumi Nakagawa. A case of acquired dysfibrinogenemia in multiple myeloma treated with therapeutic plasma exchange. Transfusion and apheresis Science 2013; 48:35-38.

Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS. Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of Gralnick HR, Connaghan DG. Hereditary abnormalities of fibrinogen. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Williams Hematology. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1995:1439.

Gris JC, Schved JF, Branger B, Aguilar-Martinez P, Vecina F, Oules R, et al. Autoantibody to plasma fibrinopeptide A in a patient with a severe acquired haemorrhagic syndrome. Blood Coagul Fibrinolysis 1992; 3:519-29.

Groop-L. Stenman-S. Groop-P-H. Makiperna-A. Teppo-A-M. Fourth Department of Medicine, Helsinki University Hospital, Finland. The effect of exercise on urinary excretion of different size proteins in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. - Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 1990; 50: 525-32.

Haidaris PJ, Courtney MA. Tissue-specific and ubiquitous expression of fibrinogen gamma-chain mRNA. Blood Coagul Fibrinolysis 1990; 1:433.

Haidaris PJ, Courtney MA. Liver-specific RNA processing of the ubiquitously transcribed rat fibrinogen gamma-chain gene Blood 1992; 79:1218.

Hall CE, Slayter HS. The fibrinogen molecule:its size, shape and mode of polymerization. J Biophys Biochem Cytol 1959; 5:11.

Hamaguchi, M., L.A. Bunce, L.A. Sporn, et al. Spreading of platelets on fibrin is mediated by the amino terminus of the β chain including peptide β 15–42. Blood 1993; 81: 2348–2356.

Hassan JH, Chelucci C, PeschleC, et al. TGF- β inhibits expression of fibrinogen and factor VII in a hepatoma cell line. Thromb Haemost 1992; 67:478.

Haverkate F, Samama M. Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia: report on a study of the SSC Subcommittee of Fibrinogen. Thromb Haemost 1995; 73:151–161.

Heldin P, Hessel B, Humble E, Blomback B, Engstrom L. Thromb Res 1987; 47:93.

Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Pieter H. Reitsma Physiol New fundamentals in hemostasis 2013; Rev 93: 327–358.

Henschen A. Disulfide bridges in the middle part of human fibrinogen. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1978; 359:1757.

Henschen A; Lottspeich F; Kehl M; Southan C. Covalent structure of fibrinogen Ann N Y Acad Sci 1983; 408:28-43.

Hoeprich PD, Doolittle RF. Dimeric half-molecules of human fibrinogen are joined through disulfide bonds in an antiparallelal orientation. Biochemistry 1983; 22:2049.

Hoffman M: A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Rev 2003; 17(suppl 1):S1–S5.

Hortin G.L. Biochem Int 1989; 19:1355.

Hu CH, Harris JE, Davie EW, et al. Characterization of the 5'flanking region of the gene for the α chain of human fibrinogen. J Biol Chem 1995; 270:28342.

Huang S, Cao Z, Davie EW. The role of N-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190:488.

Huber P, Laurent M, Dalmon J. Human b-fibrinogen gene expression. Upstream sequences involved in its tissue specific expression and its dexamethasone and IL-6 stimulation. *J Biol Chem* 1990; 265:5695.

Ismail A.E. Purification of fibrinogen from human plasma. *Chemical and Biomolecular Engineering Theses, Dissertations and student Research*. 2012; 13: 18-22.

Iwanaga S, Blomback B, Grondhal NH, et al. Amino acid sequence of the N-terminal part of gamma-chain in human fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1968; 160:280.

Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1602–1612.

Jacobson W, Park GR, Saich T, et al. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Br J Anaesth* 1993; 70:522.

Jesty J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. *Arch Biochem Biophys* 1978; 185: 165–173.

Joel S. Bennett, Sandford J, Shattil, John W. Power and T. Kent Gartner. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor, differential effects of α and γ chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1988; 263:12948-12953.

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Gunther A, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6388–6393.

Katzmann JA, Clark R, Sanders E, Landers JP, Kyle RA. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:503-9.

Koutsis A, Papapanagiotou A, Papavassiliou AG. Thrombomodulin: from haemostasis to inflammation and tumourigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1669 –1673.

Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Idiopathic Bence Jones proteinuria - A distinct entity ? - *Am J Med* 1973; 55: 222-226.

Kyle RA, Greipp PR. - “Idiopathic” Bence Jones proteinuria: long-term follow-up in seven patients. *N Engl J Med* 1982; 306: 564-567.

Laposata M. *Medicina di Laboratorio* ed. Piccin 2012; 243-265.

Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997; 96: 3633–3640.

Laudano AP, Doolittle RF. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 3085–9.

Leung LL. The role of thrombospondin in platelet aggregation. *J Clin Invest* 1984; 74:1764.

Lewin B. “La diversità immunitaria”. In Lewin B., *Il Gene VIII*. Bologna, Zanichelli Editore 2006; 782-817.

Ling NR, Lowe J, Hardie D, Evans S, Jefferis R. Detection of free kappa chains in human serum and urine using pairs of monoclonal antibodies reacting with C kappa epitopes not available on whole immunoglobulins. *Clin Exp Immunol* 1983; 52: 234 – 40.

Lino, M., H. Takeya, T. Takemitsu, et al. 1995. Characterization of the binding of factor Xa to Liu CY, Koehn JA, Morgan FJ. Characterization of fibrinogen New York 1. *J Biol Chem* 1985; 260: 4390–6.

Llobet D. , M. Borrel, L.Vila, C.Vallvè, R.Felices, J.Fontcuberta. An acquired inhibitor that produced a delay of FpB release in an asymptomatic patient. *Haematologica* 2007; 92: (2)e17-e19.

Lord ST, Fowlkes DM. Expression of a fibrinogen fusion peptide in E.coli: a model thrombin substrate for structure-function analysis. *Blood* 1989; 73:166.

Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498–499.

Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg* 2009; 108:1447–1452.

Mammen EF. Coagulation defects in liver disease. *Med Clin North Am*.1994; 78:545–554.

Marder VJ, Shulman NR, Carroll WR. The importance of intermediate degradation products of fibrinogen in fibrinolytic hemorrhage. *Trans Assoc Am Physicians* 1987; 80:156.

Marguerie GA, Plow EF, Edington TS. Human platelet possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 1979; 254:5357.

Mark.T Cunningham, MD; John T. Brandt, MD; Michael Laposata, MD, PhD; John D.Olson, MD, PhD. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:499-505.

Martinez J, MacDonald KA, Palascak JE. The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with liver disease: distribution of sialic acid on the constituent chains. *Blood*. 1983; 61:1196–1202

McKee P.A.; Rogers L.A; Marler E; Hill R.L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1966; 116,271-279.

Miettinen TA, Kekki M. Effect of impaired hepatic and renal function on Bence Jones protein catabolism in human subjects. *Clin Chim Acta* 1967; 18:395-407

Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 41–48.

Mosesson MW, Finlayson JS, Umfleet RA. Human fibrinogen heterogeneities: III. Identification of γ chain variants. *J Biol Chem* 1972; 247:5223-7.

Mosesson, M. W. *semin. Hematol.* 1992; 29, 177-188.

Mosesson MW. Dysfibrinogenemia and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25:311-319.

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1894-904.

Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renne T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009; 139: 1143–1156.

Munnix IC, Cosemans JM, Auger JM, Heemskerk JW. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1149–1156.

Munnix IC, Kuijpers MJ, Auger J, Thomassen CM, Panizzi P, van Zandvoort MA, Rosing J, Bock PE, Watson SP, Heemskerk JW. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation: regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2484–2490.

Nagashima M, Lundh E, Leonard JC, Morser J, Parkinson JF. Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity. *J Biol Chem* 1993; 268: 2888–2892.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma. Approved guideline. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards 1994; NCCLS document H30-A.

Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH. Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J Biol Chem* 268: 21489–21492, 1993.

Nham S-U, Fuller GM. Effect of fibrinogen degradation products on production of hepatocyte stimulating factor by a macrophage cell line (P388D1). *Thromb Res* 1986; 44:467.

Nurden A, Nurden P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 76–91,.

Nussenzweig V, Seligmann M, Pelimont J, Grabr P. Les produits de degradation du fibrinogene humain par la plasmine. *Ann Inst Pasteur* 1961; 100:377-89.

Ohkura N., Enjyoji K., Kamikubo Y., Kato H. A novel degradation pathway of tissue factor pathway inhibitor: incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin. *Blood* 1997; 90: 1883–1892.

Ohkura, N., K. Enjyoji, Y. Kamikubo & H. Kato. 1997. A novel degradation pathway of tissue Ohler A, Redondo M, Lammle B. Increased thrombin time in a patient with multiple myeloma. *Ther Umsch.* 1999; 56:491-4.

O'Kane MJ, Wisdom GB, Desai ZR, Archbold GP. Inhibition of fibrin monomer polymerisation by myeloma immunoglobulin. *J Clin Pathol* 1994; 47:266-8.

Okumura N, Terasawa F, Tanaka H, et al. Analysis of fibrinogen γ chain truncations shows the C-terminus, particularly γ 11387, is essential for assembly and secretion of this multichain protein. *Blood* 2002; 99:3654.

Olson ST, Halvorson HR, Bjork I. Quantitative characterization of the thrombin heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J Biol Chem* 1991; 266: 6342–6352.

Olson ST, Swanson R, Raub-Segall E, Bedsted T, Sadri M, Petitou M, Herault JP, Herbert JM, Bjork I. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 2004; 92: 929–939.

Palareti G, Maccaferri M, Manotti C, et al. Fibrinogen assays: a collaborative study of six different methods. CISMEL Comitato italiano per la standardizzazione dei metodi in ematologia e laboratorio. *Clin Chem* 1991; 37:714-719.

Palascak JE, Martinez J. Dysfibrinogenemia associated with liver disease. *J Clin Invest.* 1977; 60:89–95.

Pallotti G. et al. Valutazione Multicentrica di Metodi e Protocolli per le Catene Leggere Libere e Proteine di Bence Jones in urine - Primi Risultati. *Biochimica Clinica* 1995; 19: 410-425.

Pandya BV, Cierniewski CS, Budzynski AZ. Conservation of human fibrinogen conformation after cleavage of the Bb-chain NH₂-terminus. *J Biol Chem* 1985; 260: 2994–3000.

Pauer HU, Renne T, Hemmerlein B, Legler T, Fritzlar S, Adham I, Muller-Esterl W, Emons G, Sancken U, Engel W, Burfeind P. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 2004; 92: 503–508.

Peerschke EIB. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hemat* 1985; 22:241.

Petrovan RJ, Ruf W. Residue Met(156) contributes to the labile enzyme conformation of coagulation factor VIIa. *J Biol Chem* 2001; 276: 6616–6620.

Pizzo SV, Schwartz ML, Hill RL, et al. The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J Biol Chem* 1972; 247:636.

Plow, E. F., McEver, R. P., Collier, B. S., Woods, V. L., Jr., Marguerie, G. A., and Ginsberg, M. H. *Blood* 1985; 66: 724-727.

Podolnikova NP, Yakubenko VP, Volkov GL, et al. Identification of a novel binding site for platelet integrins α IIb β 3 and α 5 β 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. *J Biol Chem* 2003; 278:32251-32258.

Polack B, Valiron O, Concord E, Freyssinet JM, Hudry-Clergeon G. Molecular characterization of abnormal fibrinogen by two-dimensional electrophoresis. *Clin Chem.* 1984; 30:2093–2097.

Rao SP, Poojary MD, Elliott BW Jr, et al. Fibrinogen structure in projection at 18 Å resolution. Electron density by co-ordinated cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* 1991; 222:89.

Ratnoff OD, Colopy JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 1955; 34: 602–613.

Redman CM, Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936:480.

Remijn JA, Ijsseldijk MJ, van Hemel BM, et al. Reduced platelet adhesion in flowing blood to fibrinogen by alterations in segment gamma 316-322, part of the fibrin-specific region. *Br J Haematol* 2002; 117:650.

Renne T, Gailani D. Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5: 733–741.

Ritchie DG, Levy BA, Adams MA, et al. Regulation of fibrinogen synthesis by plasmin derived fragments of fibrinogen and fibrin: an indirect feedback pathway. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79:1530.

Ruggeri, Z. M., De Marco, L., Gatti, L., Bader, R., and Montgomery, R. R. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 1-12.

Ruiz-Arguelles A. Spontaneous reversal of acquired autoimmune dysfibrinogenemia probably due to an antiidiotypic antibody directed to an interspecies cross-reactive idiotype expressed on antifibrinogen antibodies. *J Clin Invest* 1988; 82:958-63.

Sakariassen, K. S., Boehuis, P. A., and Sixma, J. J. *Nature* 1979; 279:636-638.

Savage B, Ruggeri ZM. Platelet thrombus formation in flowing blood. In: *Platelets*. Burlington: Academic 2007; 359–367.

Scheraga HA, Laskowski MJr. The fibrinogen-fibrin conversion. *Adv Protein Chem* 1957; 12: 1–131.

Shafer, J.A., and Higgins, D.L. *CRC Crit. Rev. Clin.Lab.Sci.* 1988; 26: 1-14.

Shainoff JR, Dardik BN. Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: physiologic significance in delayed release of the peptide. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408: 254–67.

Siebenlist, K.R., D. Meh & M.W.Mosesson. Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin 2001; 86 : 1221-8.

Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, Morrissey JH. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood* 2010; 116: 4353–4359.

Smith SA: Overview of hemostasis, in Weiss D, Wardrop J (eds): *Schlam's Veterinary Hematology*. Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins 2011; 635–653.

Solling K. Free Light Chains of Immunoglobulins. *Scan J Clin Lab Invest.* 1981; 157:1 - 83.

Solomon 1 A. Bence Jones proteins: malignant or benign? *N Engl J Med* 1982; 306: 605-607.

Solomon A. Light chains of human immunoglobulins. *Methods Enzymol* 1985; 116:101-21.

Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med* 2011; 89: 109–121.

Straub PW. A study of fibrinogen production by human liver slices in vitro by immunoprecipitation method. *J Clin Invest* 1963; 42:130.

Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S, Horiguchi S. Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J* 1987; 6: 1891–1897.

Swords N, Mann KG. Thrombin. In: Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, edited by RW Colman, VJ Marder, AW Clowes, JN George. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 171–189.

Takagi T, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on plasmin-derived fragments of human fibrinogen: N-terminal sequences of intermediate and terminal fragments. *Biochemistry* 1975; 14:940.

Takeda Y. Studies of the metabolism and distribution of fibrinogen in healthy men with autologous ¹²⁵I-labeled fibrinogen. *J Clin Invest* 1966; 45:103.

Tillyer CR, Iqbal J, Raymond J, Gore M, McIlwain TJ. Immunoturbidimetric assay for estimating free light chains of immunoglobulins in urine and serum. *J Clin Pathol* 1991; 44: 466–71.

Topfer-Petersen E, Lottspeich F, Henschen A. Carbohydrate linkage site in the beta-chain of human fibrin. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1976; 357:1509.

Townsend RR; Hilliker E; Li YT; Laine RA; Bell WR; Lee YC. *J Biol Chem* 1982; 257:9704-9710.

Undas A, Zabczyk M, Iwaniec T. Dysfibrinogenemia: from bleeding tendency to thromboembolic disorders. *Boletim da SPM* 2011; 26: 5-17.

Van der Meijden PE, Munnix IC, Auger JM, Govers-Riemslog JW, Cosemans JM, Kuijpers MJ, Spronk HM, Watson SP, Renne T, Heemskerk JW. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood* 2009; 114: 881–890.

Vasse M, Paysant I, Soria J, et al. Down regulation of fibrinogen biosynthesis by IL-4, IL-10 and IL-13. *Br J Haematol* 1996; 93:955.

Von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; 209: 819–835.

Von Felton A, Straub PW, Fricj PG. Dysfibrinogenemia in a patient with primary hepatoma: first observation of an acquired abnormality of fibrin monomer polymerization. *N Engl J Med*. 1969; 280:405–409.

Wakasugi K, Suzuki H, Imai A, Konishi S, Kishioka H. Immunoglobulin free light chain assay using latex agglutination. *Int J Clin Lab Res* 1995; 25: 211 – 5.

Waldmann TA, Strober W, Mogielnicki RP. The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia. *J Clin Invest* 1972; 51:2162-74

Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1456–1467.

Weisel J, Stauffacher CV, Bullitt E, et al. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* 1985; 230:1388.

Weisel JW, Phillips GN, Cohen C. A model from electron microscopy for the molecular structure of fibrinogen and fibrin. *Nature* 1981; 289:263.

Weisel JW, Medved' LV. The structure and function of the α C domains of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:312-27.

Weiss, H. J., Baumgartner, H. R., Tschopp, T. B., Turitto, V. T., and Cohen, D. *Blood* 1978; 51:267-279.

Weiss, H. J., Hawiger, J., Ruggeri, Z. M., Turitto, V. T., Thiagarajan, P., and Hoffman, T., *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 288-297.

Weissbach L, Grieninger G. Bipartite mRNA for chicken α fibrinogen potentially encodes an amino acid sequence homologous to β and γ fibrinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5198.

Wolfenstein-Todel C, Moesson MW. Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:5069-73.

Zhang, J.-Z. & C.M. Redman. Identification of B β chain domains involved in human fibrinogen assembly. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:21727-21732.

Zhang J-Z, Kudryc B, Redman CM. Symmetrical disulfide bonds are not necessary for assembly and secretion of human fibrinogen. *J Biol Chem* 1993; 268:11278.

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121–1132.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il prof. Aldo Paolicchi, mio relatore e ideatore di questo studio, per i suoi insegnamenti e la sua disponibilità.

Ringrazio la dott.ssa Laura Caponi e la dott.ssa Sonia Albertini del Laboratorio di Patologia Clinica Universitario dell'AOU Pisana per l'attenta opera di revisione effettuata sulla tesi ed i loro preziosi consigli.

Ringrazio la dott.ssa Nadia Cecconi dell'U.O. di Ematologia dell'AOU Pisana per la presenza costante durante tutta la durata dello studio e per l'aiuto, le idee ed i consigli, fondamentali per la stesura di questo lavoro.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Agnese Bimbi, mia compagna di avventura degli ultimi sei mesi, per il suo prezioso aiuto e la dott.ssa Maria Franzini per i suoi insegnamenti e consigli.

Un ringraziamento ai miei colleghi del Laboratorio di Patologia Clinica per il supporto durante il mio percorso universitario ed un ringraziamento particolare è diretto a Gloria Campeol per la sua completa disponibilità e comprensione.

Un ultimo, ma più importante ringraziamento, è rivolto a Renzo e ad Alice per la loro pazienza e comprensione e alla mia mamma Elsa per il suo supporto ed aiuto. È a loro tre che dedico questo lavoro.